
BIOAKTIVE LIPIDE - FUNKTIONALE LIGANDEN DES LIPIDSTOFFWECHSELS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

von Andreas Lill
aus Hanau

vorgelegt am Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2014
(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. T. Prisner
1. Gutachter: Prof. Dr. H. Stark
2. Gutachter: Prof. Dr. D. Steinhilber
Datum der Disputation: 27.10.2014

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juli 2009 und August 2013 am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Stark angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Stark für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hilfreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge sowie die gute Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Steinhilber danke ich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten. Bei seinen Mitarbeiterinnen Frau Dr. Bettina Hofmann und Frau Carmen Rödl möchte ich mich für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt Frau Carmen Rödl für die Testung der synthetisierten 5-LO-Inhibitoren, die gemeinsame Durchführung der Labellingversuche sowie die Löslichkeitstest.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. K. Scholich und Frau Prof. Meyer zu Heringdorf bzw. ihren Mitarbeitern am Institut für Klinische Pharmakologie (Goethe-Universität) für die Charakterisierung und Testung des synthetisierten SIP-Liganden danken.

Herrn Dr. Krstic vom Arbeitskreis Priner (Institute für Physikalische und Theoretische Chemie) danke ich für die Bemühungen im Zusammenhang mit den EPR-Messungen. Dem Arbeitskreis Heckel (Organische Chemie und Chemische Biologie) danke ich für die Nutzung des Multi-LED-Reaktors und der Spektrometer, sowie Manuela Fichte für die Einweisung und den Schlüssel-dienst. Meinen JCF Kollegen in der Chemie gilt auch ein Dank für das Bereitstellen von Chemikalien und Gerätschaften. Zudem danke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie und des Fachbereiches, die mir bei der Charakterisierung und der Analytik der Liganden und Zwischenprodukte geholfen haben.

Ein großer Dank gilt allen (ehemaligen) Mitgliedern des Arbeitskreises für die ausgezeichnete Atmosphäre und die vielen schönen Stunden. Besonders Aleksandra Živković danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, den stetigen wissenschaftlichen Austausch, die zahlreichen Tipps sowie für das gute Arbeitsklima und die nette Atmosphäre zu der natürlich auch meine anderen lieben Laborkollegen Azubi Florian Nöller, Dominik Vogt und Stefano Woltersdorf beigetragen haben. Borostyan dir danke ich für Alles.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich für die Unterstützung während der Promotion bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS:

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHER HINTERGRUND	4
2.1 LIPIDE	4
2.2 SPHINGOLIPIDE	7
2.2.1 Anaboler und kataboler Weg der Sphingolipide	7
2.2.2 Konzentrationsabhängige Vernetzung	9
2.2.3 Sphingolipid-Stoffwechsel in der Zelle	9
2.2.4 Balance zwischen Ceramid-Sphingosin-S1P: (patho)- / physiologische Wirkung	12
2.2.5 S1P-Rezeptoren	16
2.2.5.1 G Proteinkopplung und pharmakologische Charakterisierung	16
2.2.5.2 Rezeptor vermittelte S1P Effekte: (patho)-/physiologische Wirkung	18
2.2.5.3 Fingolimod	20
2.2.5.3.1 Wirkungsweise von Fingolimod und MS-Pathologie	20
2.2.5.3.2 Nebenwirkungen und off-target-Effekte von Fingolimod	23
2.2.6 Inhibitoren des Sphingolipidstoffwechsels	25
2.2.6.1 Enzyminhibitoren	25
2.2.6.2 S1P-Rezeptorliganden	27
2.2.7 Bindungsmodus an S1P-Rezeptoren	34
2.3 PHARMAKOLOGISCHE TOOLS:	
MOLEKULARES IMAGING UND LABELING	37
2.3.1 Fluoreszenz-Labeling	37
2.3.2 Kovalentes Labeling und Photoaffinity-Labeling	38
2.4 5-LIPOXYGENASE	41
2.4.1 Katalytischer Mechanismus	42
2.4.2 Expression und Regulation	42
2.4.3 5-LO Enzym	43
2.4.4 Stimulation und Regulation der 5-LO	44
2.4.5 (Patho)-/physiologische Effekte von Leukotrienen	46
2.4.6 Anti-LT-Wirkstoffe	48
2.4.6.1 Modulatoren der LTA4-Hydrolase, LTC4-Synthase und LT- Rezeptorantagonisten	48
2.4.6.2 Inhibition der 5-LO	51
2.4.6.2.1 FLAP-Inhibitoren	51
2.4.6.2.2 Direkte 5-LO-Inhibitoren	52
2.4.6.2.3 Thiazolon-basierte 5-LO-Inhibitoren	56
2.4.6.2.4 Charakterisierung von C06 und bisheriger Derivate	57

3. ZIELSETZUNG & MOTIVATION	59
3.1 SPHINGOLIPIDE	59
3.2 5-LIPOXYGENASE	60
4. SYNTHETISCHER TEIL	61
4.1 S1P ₁ -LIGANDEN	61
4.1.1 Konzept	61
4.1.2 Synthesen	64
4.1.2.1 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Grundstrukturen	64
4.1.2.2 Fluoreszenzmarkierte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole	65
4.1.2.3 4-DMAP-gelabelte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole	67
4.1.2.4 Coumarin-Triazol-gelabeltes 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol	69
4.1.2.5 5-Fluorophor-3-Aryl-1,2,4-Oxadiazol	71
4.1.2.6 Potentiell kovalentbindende Liganden der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol Serie	73
4.1.2.7 Optimierung der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Leitstruktur	74
4.1.2.8 Fluoreszenzmarkierten 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazolpropansäure-derivate	75
4.1.2.9 Fluoreszenzmarkierte 5-(3'-substituierte Aryl)-3-Aryl-oxadiazole	77
4.1.2.10 Liganden für S1P ₅ -Rezeptor	80
4.2 5-LIPOXYGENASE (5-LO)	81
4.2.1 Konzept	81
4.2.2 Synthesen	82
4.2.2.1 Allgemeine Synthese der Aryliden-Aryl-Thiazolone	82
4.2.2.2 Polare Aryliden-Aryl-Thiazolone mit unterschiedlichen elektronischen und Wasserstoffbrückenbindungs-Eigenschaften	86
4.2.2.3 Morpholin substituierte Aryliden-Aryl-Thiazolonderivate	87
4.2.2.4 Halogen- und Trifluormethyl-Substituenten am 3'-Ring der Aryliden-Aryl-Thiazolone	88
4.2.2.5 Heteroaryliden-Aryl-Thiazolone	89
4.2.2.6 Potentiell irreversibel bindende C06-Derivate	90
4.2.2.7 C06-Kernvariationen	93
4.2.2.7.1 Furan- und Pyrrol-C06-Analoga	93
4.2.2.7.2 Oxazol-5(4H)-on- und Imidazol-C06-analogen	94
4.2.2.7.3 Oxi-C06-Analogen (Oxazol-5(4H)-on)	94
4.2.2.7.4 Sulfoxid-C06-Analogen	95
4.2.2.7.5 Thion-C06-Analogen	95
4.2.2.7.6 Imino-C06-Analogen	96
4.2.2.7.7 Amino-/Imino-Thiazolon-C06-Analogen	96
4.2.2.7.8 Thioxathiazolidinon-C06-Analogen	97
4.2.2.7.9 N-Methyl-C06-Analogen	98
4.2.2.8 Arylidenvariationen	99
4.2.2.8.1 Substituierte und verlängerte Ylideneinheit	99
4.2.2.8.2 Nicht-aromatische Yliden-Substituenten	99
4.2.2.8.3 C06 mit „hydrierter Doppelbindung“	100

4.2.2.8.4 Aryl-Aryl-Hydroxythiazole	102
4.2.2.8.5 Aryl-Aryl-Methylthiazol	102
4.2.2.9 Optimierte Aryl-(Methylen)-Aryl-Hydroxythiazole	103
5. DISKUSSION UND ERGEBNISSE / PHARMAKOLOGISCHE TESTUNG	104
5.1 $S1P_1$ -LIGANDEN	104
5.1.1 <i>Dynamische Massen-Umverteilung (DMR) zur Messung der Bindungsaffinität</i>	104
5.1.2 <i>Bestimmung der Bindungsaffinitätsmessung $S1P_1$-Liganden mittels DMR</i>	105
5.1.3 <i>Bestimmung der Liganden vermittelten Internalisierung von $S1P_1$-GFP</i>	108
5.1.4 <i>Beeinflussung der $S1P_5$-vermittelten Expression von CTGF durch ST-1715 – ST-1719</i>	109
5.2 5-LO-INHIBITOREN	110
5.2.1 <i>Bestimmung der Inhibition der 5-LO-Produktbildung</i>	110
5.2.2 <i>Toxizitätsmessungen</i>	110
5.2.3 <i>Inhibition der 5-LO-Produktbildung der synthetisierten Substanzen in PMNL- und S100-Assay</i>	112
5.2.3.1 <i>Polare Substituenten am 5-Aryliden-Rest</i>	112
5.2.3.2 <i>Morpholinoderivate</i>	114
5.2.3.3 <i>Heteroaryl Aryliden-Aryl-Thiazolone</i>	115
5.2.3.4 <i>Substituierte und zum kovalenten/Photoaffinity-Labeling fähige Aryliden-Aryl-Thiazolone</i>	117
5.2.3.5 <i>Kernvariationen</i>	119
5.2.3.6 <i>Arylidenvariationen</i>	121
5.2.3.7 <i>Weiterentwicklung und Optimierung der 2,5-Diaryl-4-hydroxythiazole</i>	122
6.2.4 <i>5-LO-Inhibitionspotential in Gegenwart von fetalem Kälberserum</i>	125
6.2.5 <i>Toxizitätsmessungen ausgewählter synthetisierten Substanzen</i>	127
6.3 AKTIVITÄTEN AUSGEWÄHLTER LIGANDEN AM FARNESOID X REZEPTOR (FXR)	128
6. LABELINGEXPERIMENTE	130
6.1 KOVALENTES LABELING (WASH-OUT VERSUCH)	130
6.2 PHOTOAFFINITY-LABELING	130
6.2.1 <i>EPR-Messungen von ST-1694</i>	130
6.2.2 <i>Bestrahlungsexperimente</i>	131
6.2.3 <i>Photoaffinity-Labeling und wash-Out Versuch</i>	132
7. ZUSAMMENFASSUNG	133

8. EXPERIMENTELLER TEIL	140
8.1 SYNTHESE DER SPHINGOLIPID-LIGANDEN	141
8.1.1 <i>Synthese der Oxadiazolgrundgerüste</i>	141
8.1.2 <i>Synthese der Oxadiazollinkerderivate</i>	159
8.1.3 <i>Synthese der Fluorophore / Fluorophorvorstufen</i>	169
8.1.4 <i>Synthese der fluoreszenzmarkierten SIP₁-Tools</i>	176
8.1.5 <i>Synthese der kovalent Labeling SIP₁-Tools</i>	186
8.1.6 <i>Synthese der SIP₅-Liganden</i>	188
8.2 SYNTHESE DER 5-LO-INHIBITOREN	193
8.2.1 <i>Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion</i>	193
8.2.2 <i>Synthese von Thiazol-4(5H)-one bzw. Vorstufen</i>	200
8.2.3 <i>Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Kondensation mit Thiazol-4(5H)-onen</i>	202
8.2.4 <i>Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch andere Reaktionen</i>	209
8.2.5 <i>Synthese von Aldehyden und andere Bausteinen</i>	213
8.2.6 <i>Synthese der zum kovalent Labeling fähigen Aryl-Aryl-Thiazolone</i>	221
8.2.7 <i>Synthese der C06 Derivate</i>	226
8.2.7.1 <i>Synthese der Derivate mit variiertem Kern</i>	226
8.2.7.1.1 <i>Synthese des Furan- und Pyrrol-C06-Analogons</i>	226
8.2.7.1.2 <i>Synthese des Oxazol- und Imidazol-C06-Analogons</i>	229
8.2.7.1.3 <i>Synthese des Oxi-C06-Analogons (<i>Z</i>)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolyloxazol-4(5H)-on)</i>	232
8.2.7.1.4 <i>Synthese von Thion-C06</i>	237
8.2.7.1.5 <i>Synthese des Imino-C06 und dessen Derivaten</i>	238
8.2.7.1.6 <i>Synthese von Amino-/Imino-Thiazolon-C06-Analoga</i>	240
8.2.7.1.7 <i>Synthese des Thioxothiazolidinon-C06-Analogons</i>	242
8.2.7.1.8 <i>Synthese des N-Methyl-C06-Analogons</i>	245
8.2.7.2 <i>Synthese der Derivate mit variiertem Arylideneinheit</i>	247
8.2.7.2.1 <i>Synthese der substituierten und des verlängerten Yliden-C06-Analogon</i>	247
8.2.7.2.2 <i>Synthese der Derivate mit Nicht-aromatischem Yliden- Substituenten</i>	250
8.2.7.2.3 <i>Synthese des „Yliden-reduzierten“ C06</i>	255
8.2.7.2.4 <i>Synthese des C06-Derivats ohne Methyleneneinheit</i>	258
8.2.7.2.5 <i>Synthese der Methylthiazolderivats</i>	261
8.2.7.3 <i>Synthese der optimierten Aryl-(Methylen)-Aryl-Hydroxythiazole</i>	262
8.3. ABSORPTIONS- UND EMISSIONSSPEKTREN	264
8.3.1 <i>SIP₁-Liganden</i>	264
8.3.2 <i>SIP₁-Liganden mit optimierter Leitstruktur</i>	267
8.3.3 <i>Absorptionsspektren der 5-LO-Inhibitoren zum kovalenten Labeling</i>	268

8.4 PHARMAKOLOGISCHE TESTUNG	269
8.4.1 <i>Protokoll der Internalisierungsversuche mit GFP-S1P₁ transfizierten HEK-293-Zellen</i>	269
8.4.2 <i>Präparation der Polymorphonuklearen Leukozyten</i>	269
8.4.3 <i>Bestimmung der 5-LO-Produktbildung in Polymorphonuklearen Leukozyten</i>	269
8.4.4 <i>Bestimmung der 5-LO-Produktbildung im zellfreien Assay (S100)</i>	269
8.4.5 <i>Bestimmung der 5-LO-Produktbildung mit Wash-Out</i>	270
9. ABKÜRZUNGEN	271
10. LITERATURVERZEICHNIS	277
11. ANHANG	299

1. Einleitung

Bioaktive Lipide wie Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane und Lipoxine), Phosphoinositide und Sphingolipide kontrollieren essentielle zelluläre Vorgänge, obwohl sie lange Zeit nur für Membranbausteine und Energiespeicher gehalten wurden. Sie nehmen Einfluss auf die Zellproliferation, die Apoptose, den Metabolismus, die Migration und das Zellverhalten, was wiederum viele physiologische und pathophysiologische Prozesse beeinflusst. Die Pathogenese vieler Erkrankungen geht mit einem gestörten Lipidstoffwechsel einher. Dieses Ungleichgewicht bedingt dabei die pathologische, veränderte Zellfunktion. Chronische Entzündungen, Autoimmunreaktionen, Allergien, Arteriosklerose, kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck und Herzhypertrophie, degenerative, metabolische als auch Krebserkrankungen gehören zu den Krankheitsbildern, in denen ein beeinträchtigtes Lipidsignalling vorliegt.^[1,2]

Viele der Signallipide, ihre meta- und katabolischen Enzyme und die nachgeschalteten Zielmoleküle fügen sich zu einem miteinander verbundenem, hoch komplexen Gesamtnetzwerk zusammen, weshalb in den verschiedenen Krankheitsbildern meist auch mehrere Lipidsignalwege fehlreguliert sind.^[1]

Das Zusammenspiel der Lipid-verändernden Enzyme in den verschiedenen Krankheitsbildern ist in Abbildung 1 nach Wymann *et al.*^[1] verdeutlicht. Die Größenordnung, die eine Modulation des Lipidsignalling im Bezug auf eine Krankheit haben könnte, ist dabei als farbige Fläche dargestellt.

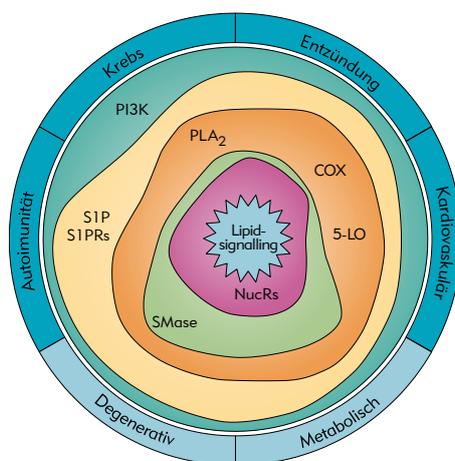


Abbildung 1: Schematische Darstellung der im Lipidsignalling beteiligten Enzyme und Rezeptoren mit potentielltem Indikationsgebiet.^[1] Die Fläche bzw. Ausdehnung der farbigen Fläche repräsentiert dabei das Ausmaß an der Modulation der jeweiligen Enzyme bzw. Rezeptoren. (NucRs = nukleären Rezeptoren; SMase = Sphingomyelinase; PLA₂ = Phospholipase A₂; COX = Cyclooxygenase; 5-LO = 5-Lipoxygenase; S1P = Sphingosin-1-Phosphat, S1PRs = S1P-Rezeptoren; PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase)

Viele Krankheitsbilder werden nicht nur durch eine Lipidsignalkaskade beeinflusst. Beim Metabolischen Syndrom zum Beispiel führt ein entzündlicher Prozess zur Entstehung von Typ-II Diabetes, Arteriosklerose oder zu einer kardiovaskulären Erkrankung.^[3] Im Falle von Krebserkrankungen wird durch ein gesteigertes Lipidsignalling das normale Zell- und Gefäßwachstum zur Ausbildung von Tumoren genutzt.^[1,4]

Einen tieferen Einblick in das komplexe Zusammenspiel zwischen Signallipiden, Lipid-modifizierenden Enzymen und den involvierten Proteine und Rezeptoren im Bezug auf entzündliche, metabolische und Krebserkrankungen gibt Abbildung 2.

1. Einleitung

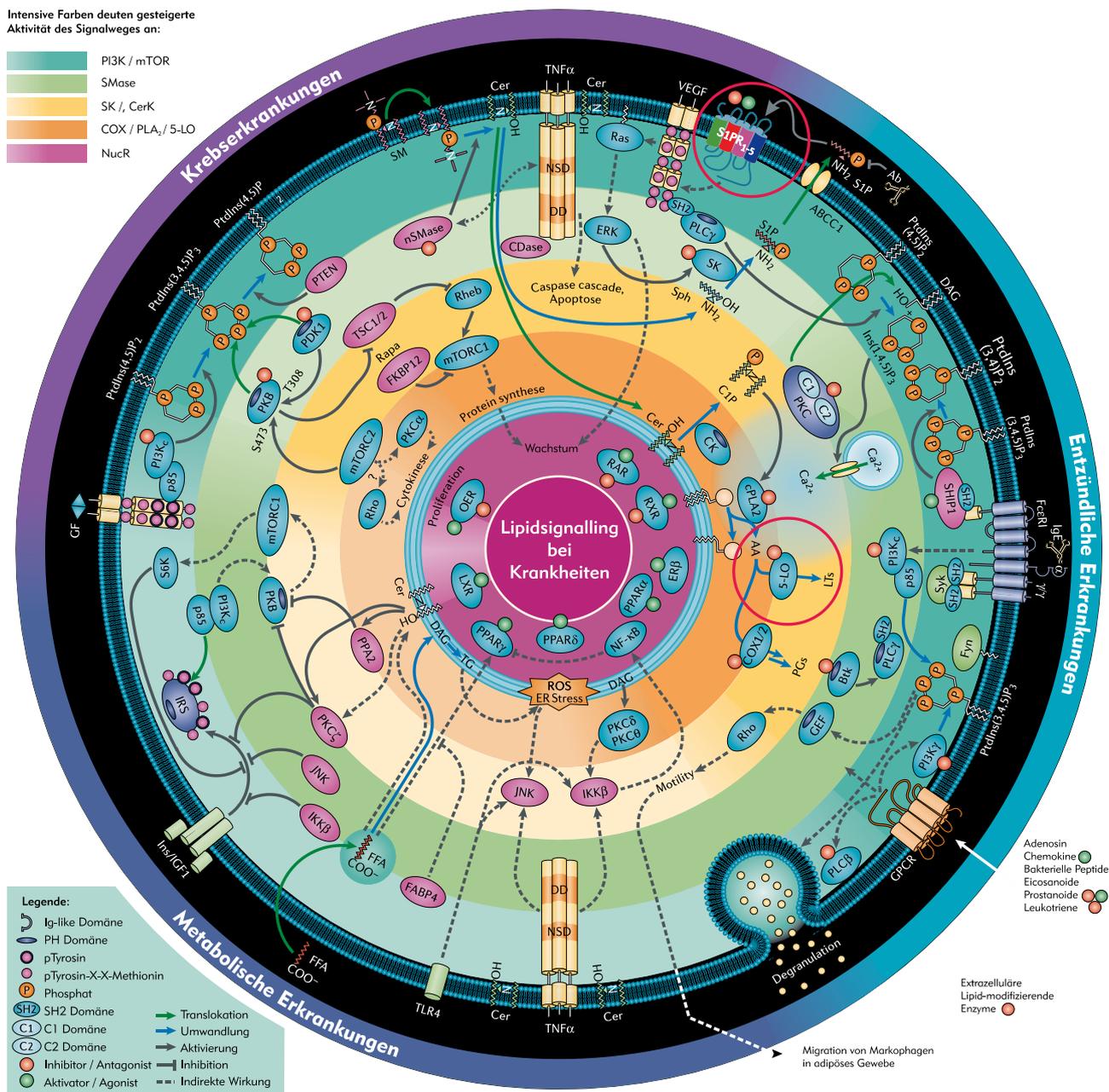


Abbildung 2: nach [5] Lipidsignallwege in bestimmten Krankheitsbildern und ihr Zusammenhang: C1/2 Domäne = konservierte Region 1/2; CIP = Ceramid-1-Phosphat; Cer = Ceramid; CK = Ceramidkinase; cPLA₂, zytosolische PLA₂; DAG = Diacylglycerol; ERK = extrazelluläre Signal-regulierte Kinase, FABP4, Fettsäure-bindendes Protein-4; FcεR1 = hochaffiner IgE Rezeptor; FFA = freie Fettsäure; GEF = Guaninnukleotid Austauschfaktor; GF = growth factor (Wachstumsfaktor); Ig = Immunoglobulin; IGF = Insulin *gf*; IKK = Inhibitor von NF-κB; Ins = Insulin; Ins(1,4,5)P₃ = Inositol-1,4,5-trisphosphat; IRS = Insulinrezeptorsubstrat; JNK = c-Jun N-terminale Kinase; LT = Leukotriene, LXR = Leber X-Rezeptor; mTORC = mammalian target of rapamycin complex (humaner Ziel von Rapamycin-Komplex); NSD = nSMase Domäne; nSMase = neutral Sphingomyelinase; OER = Östrogenrezeptor; PDK1 = Phosphoinositid-abhängige Kinase-1; PG = Prostaglandine; PGH2S = ProstaglandinH₂ Synthase; PH = Pleckstrin Homologie; PI3Kc = katalytische Einheit der PI3K; PKB = Proteinkinase B; PKC = Proteinkinase C; PLA₂/C = Phospholipase A₂/C; PPAR = Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor; PtdIns(3,4,5)P₃ = Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; PtdIns(4,5)P₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PTEN = Phosphatase und Tensinhomologie; pTyr = phosphoryliertes Tyrosin; RAR = Retinsäurerezeptor; Rapa = Rapamycin (der FKBP12-*rapa* Komplex fungiert als mTOR Inhibitor); Rheb = Ras homologue enriched in brain; ROS = reaktive Sauerstoffspezies; RXR = Retinoid X Rezeptor; SH = Src (sarcoma) Homologie; SHIP1 = SH2 Inositol-5-phosphatase-1; Sph = Sphingosin; SK = Sphingosinkinase; TG = Triacylglycerol; TLR, Toll-like Rezeptor; TNFα = Tumor Nekrose Faktor α; TSC = Tuberosöse Sklerose Komplex; VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor.

1. Einleitung

Der Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K) / mTOR-Weg (Ziele des Rapamycins im Säugetier; blau-grüner, äußerster Kreis in Abbildung 2) beeinflusst fundamental das Zellwachstum, die Proliferation, die Zellmobilität und das Überleben der Zellen^[6,7] und ist im Bereich der Krebserkrankungen und entzündlicher Prozesse besonders aktiv. Entzündliche Prozesse wiederum werden hauptsächlich durch die Lipidmediatoren des Cyclooxygenase/Phospholipase A₂/5-Lipoxygenase-Weges beeinflusst (COX/PLA₂/5-LO; orange in Abbildung 2). Der PI3K/mTOR-Weg steht im direkten Kontakt mit den Sphingolipiden und den Enzymen des SMase-Wegs (Sphingomyelinaseweg, grünlich in Abbildung 2). Die Sphingolipid, vor allem Sphingomyelin und Ceramid, nehmen Einfluss auf die Apoptose, den Zellzyklus und die Zellalterung. Sie sind direkt in Sphingosin, Sphingosin- und Ceramid-1-Phosphat überführbar.^[8,9] Der in Abbildung 2 gelbliche dargestellte SK/CK-Weg (Sphingosin- / Ceramidkinase) interferiert auch mit dem PI3K/mTOR-Weg und ist unter anderem über den Ca²⁺-Haushalt mit dem COX/PLA₂/5-LO-Weg verbunden (orange in Abbildung 2). C1P und auch SM üben ferner einen direkten Einfluss auf die zytosolische PLA₂ (cPLA₂) aus.^[10] Der SK/CK-Weg und der SMase-Weg haben dabei entgegengesetzte Wirkung auf das Überleben der Zelle, was unter anderem in Krebserkrankungen zum Tragen kommt. Die Lipide des COX/PLA₂/5-LO-Weges regulieren die physiologische als auch die pathophysiologische Gewebshomöostase, spielen im Immunsystem und der Entstehung bzw. dem Voranschreiten von Entzündung eine wichtige Rolle.^[11] Die in diesem Weg generierten Lipide (Eicosanoide), und auch S1P, vermitteln ihre Wirkung dabei auch über extrazelluläre G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und üben weiterhin einen direkten Einfluss auf nukleäre Rezeptoren aus (NucR, pinker Kreis in Abbildung 2). Die nukleären Hormon-Rezeptoren, wie der Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptor (PPARs), Farnesoid X und Leber X- Rezeptor (FXR/LXR) ihrerseits beeinflussen die Genregulation und regulieren den Energie- und Fettsäurehaushalt der Zelle.^[12] Fettsäure stellen die Ausgangsstoffe für alle bioaktiven Lipide dar und werden daher auch durch die nukleären Rezeptoren beeinflusst. Die Akkumulation von Fettsäure führt zu zellulärem und oxidativen Stress, der sich in metabolischen Erkrankungen^[13] manifestiert.^[1]

Trotz der Verwobenheit der bioaktiven Lipide, sind die Folgen eines gestörten Lipidsignalling, durch gezielte Modulation der involvierten Enzyme und Rezeptoren, grundsätzlich therapeutisch adressierbar. In einigen Bereichen existieren bereits Therapeutika mit denen die Symptome oder das Fortschreiten einer Erkrankung gelindert werden kann. In dem für diese Arbeit relevantem Bereich der Sphingolipide ist Fingolimod das erste zugelassene Medikament und wird zur Behandlung von Multiples Sklerose eingesetzt, die auch durch andere, das Immunsystem regulierende Signallipide beeinflusst wird.^[14] Im zweiten relevanten Bereich, dem der Leukotriene, existieren einige wenige Verbindungen (z.B. Zileuton), die zur Behandlung von Asthma und allergischen Erkrankungen zugelassen sind. In jedem Fall erschwert die Komplexität der Lipid-signalwege die Wahl des Angriffspunkts. Pharmakologische Tools können hierbei einen wichtigen Beitrag leisten, da sie es unter anderem ermöglichen die Prozesse und Umwandlungen der Lipide zu verfolgen und somit zum Verständnis des Lipidsignalling beitragen. Zudem besteht ein dringender Bedarf an neuen, selektiven Liganden für den Bereich der Sphingolipid-Rezeptoren sowie an 5-LO-Inhibitoren zum Einsatz in der anti-Leukotrientherapie.^[1]

Die Bedeutung, Wirkungsweise sowie der Katabolismus und Metabolismus der Sphingolipide und der Leukotriene wird im Folgenden detailliert erläutert.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Lipide

Lipide wurden lange Zeit nur als Energiespeicher und Membranbausteine betrachtet. Bei den Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane und Lipoxine) den Lipidmediatoren der Arachidonsäurekaskade, wurde in den 1930ern erkannt, dass sie nicht inerte Bestandteile von Zellmembranen, sondern wichtige Immunmodulatoren und vielfältige Botenstoffe sind. Bergström und Samuelsson zeigten 1964^[15], dass sie sich alle von Arachidonsäure ableiten und begründeten so die Eicosanoidforschung.^[1,16-19] Neben ihrer pathophysiologischen Bedeutung bei Fieber, Schmerz und entzündlichen Prozessen spielen sie eine entscheidende Rolle in der Homöostase, der Regulation des Blutdrucks, im Immunsystem und der vaskulären Permeabilität.^[20,21]

Die 1874 durch den deutschen Mediziner J.L.W. Tudichum entdeckten Sphingolipide wurde zunächst für Membranbestandteile bzw. ihre Abbauprodukte gehalten bis sich in den 1990 Jahren zeigte, dass sie das Zellwachstum beeinflussen und den programmierten Zelltod unterdrücken. Aufgrund der rätselhaften Funktionen dieser Fettsubstanzen, sowie der besonderen chemischen Struktur benannte sie Tudichum nach der griechischen Mythologiegestalt der Sphinx. Spätestens seit 1998 die Aktivierung eines spezifischen GPCRs durch das Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) nachgewiesen werden konnte,^[22] war die Bedeutung der Sphingolipide als Signalmoleküle bestätigt.^[23,24]

Sphingolipide und Eicosanoide zählen zur großen Klasse der Lipide bzw. werden direkt aus ihnen gebildet. Lipide lassen sich aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten grob in acht Hauptgruppen unterteilen (Abbildung 3): Fettacycle, Glycerolipide, Phospholipide, Sphingolipide, Lipopolysaccharide, Carotinoide, Steroide und Polyketide. Sie alle haben strukturell gemein, dass sie eine polare, hydrophile bzw. amphiphile Kopfgruppe mit schwer wasserlöslichen (hydrophoben) und lipophilen Strukturbestandteile besitzen.^[25]

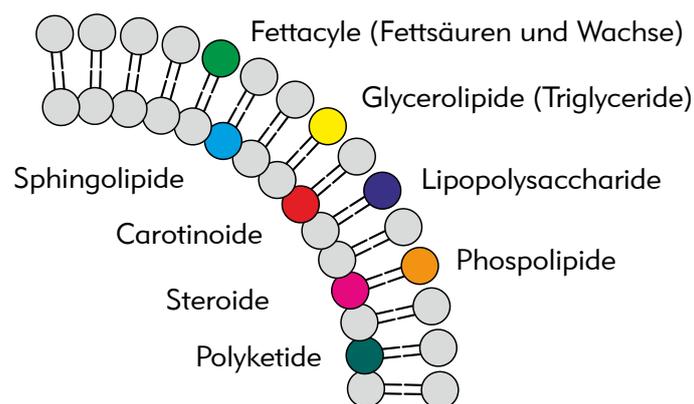


Abbildung 3: Lipidklassifizierung ^{nach[25,26]}

Fettsäuren und Wachse (Fettsäuremonoester), die die wichtigste Untergruppen der Fettacycle sind, werden durch Kettenverlängerung von aktivierten Coenzym-A-Acetylen (CoA-Acetyl) mit (Methyl)-Malonyl-CoA-Gruppen aufgebaut. Die so in der Fettsäuresynthese (Neolipogenese) generierten lipophilen/hydrophoben, gesättigten oder ungesättigten, mit bis zu 24 Kohlenstoffatomen langen, Kohlenwasserstoffketten mit polarer Carbonsäurefunktion dienen als Bausteine

2. Theoretischer Hintergrund

für die Synthese strukturell komplexerer Lipide. Zu den biologisch aktiven Fettsäuren zählen neben den Fettsäureestern (Wachse), den Fettsäureamiden, wie zum Beispiel der cannabinoide Neurotransmitter *N*-Arachidonylethanolamin, ebenfalls die Umsetzungsprodukte der Arachidonsäure, die Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane und Lipoxine).

Den größten Teil der Nahrungsfette machen die mono-, di- und tri-substituierten Glycerol-Fettsäureester, die Triglyceride oder Glycerolipide aus. Sie dienen maßgeblich als Energiespeicher. Neben den reinen Fettsäureestern des Glycerol finden sich auch an Zucker gebundene, sogenannte Glycosylglycerolipide in Zellmembranen. Glycerophospholipide, die sich von den Glycerolipiden ableiten, sind die Schlüssel-moleküle zum Aufbau der Lipid-Doppelschicht von Zellmembranen und kommen auf jeder Zelle vor. Wichtige Vertreter sind Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin, das auch im Sphingolipid-Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Die Phosphoinositide dienen unter anderem zur Freisetzung von Arachidonsäure durch Phospholipasen.

In der Fettsäuresynthese können neben Acetyl- und Malonyl-Gruppen auch andere Kohlenwasserstoffeinheiten zum Aufbau von Lipiden verwendet werden. Die aus verzweigten und ungesättigten Grundbausteinen (Isopentyl, Isopren, Dimethylallyl) aufgebauten Lipide erweitern deren Strukturvielfalt. Sterollipide und Polyketide sind wie Carotinoide bzw. Prenol-Lipide wichtige Vertreter dieser komplexeren Klassen der Lipidfamilie. Viele der weitverbreiteten Antibiotika, wie Erythromycine und Tetracycline, und anderer Wirkstoffe, wie z.B. Epothilone, gehören zur Klasse der Polyketide. Die Hormone der Estrogen-, der Androgen-, der Progestogenfamilie gehören wie das Cholesterol und seine Derivate, die essentiell für den Aufbau von Zellmembranen sind, zu den bekannten Vertretern der Sterollipide, die sich allesamt von der gleiche, anellierte Vierringstruktur ableiten.^[25,26]

Sphingolipide haben im Gegensatz zu den meisten anderen Lipiden kein Glycerol Rückgrat sondern weisen als gemeinsames Strukturelement das sphingoide Grundgerüst (s. Abbildung 4) auf, welches in einer *de novo*-Synthese ausgehend von L-Serin und einem langkettigen CoA aktiviertem Palmityl-Rest aufgebaut wird. Wie bei den meisten Lipiden wird auch bei den Sphingolipiden das Rückgrat mit verschiedenen Bausteinen zu den entsprechenden Phospho-, *N*-Acyl-(Ceramide) und Glycoderivaten verknüpft. In den Lipopolysacchariden oder Glycolipiden der Sphingolipide sind Fettsäuren direkt mit einem oder mehreren Zuckern verknüpft, weshalb sie sich als ambiphile Substanzen gut in Membrane einlagern bzw. deren Gerüststruktur ausbilden.^[23,27]

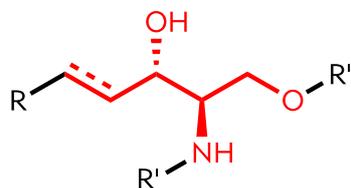


Abbildung 4: Sphingoides Grundgerüst; R = u. a. $C_{13}H_{27}$; R' = $C(O)C_{15}H_{31} - C(O)C_{20}H_{41}$, H; R'' = H, OPO_3^{2-} , Phosphatidylcholin, Zucker (z.B. Glukose oder Galaktose)

Sphingomyelin ist neben den Glycerophospholipide ebenfalls ein wichtiger Baustein zum Aufbau von doppelschichtigen Zellmembranen. An der Außenseite von Zellmembranen finden sich inselartige Regionen, die hohe Konzentrationen an Cholesterol und Sphingolipiden aufweisen, sogenannte *lipid rafts*. Lipid rafts bilden im Gegensatz zur „normalen“, sie umgebenden Doppelschicht, einen hoch dynamischen, aber geordneten, dichter gepackten und dickeren Bereich der Zellmembran aus, der als Mikroarchitektur der Zellmembran aufgefasst werden kann. Diese 10 – 200 nm großen, flächenähnliche Bereiche werden durch Cholesterol zusammengehalten. Die

2.1 Lipide

Teilnahme an der Signaltransduktion, die Wanderung von Substanzen durch die Membran (*trafficking*) und die Endo- bzw. Exozytose ist eine der wichtigsten Aufgaben von lipid rafts. Sie stellen eine Art spezialisierte Plattform dar, die in der Lage ist bestimmte Proteine (z.B. GPI-Anker Proteine), Signalmoleküle und Rezeptoren in sich aufnehmen bzw. gezielt an der Einlagerung zu hindern.^[28-30]

Sphingolipide wie auch Eicosanoide werden aus den Bestandteilen von Zellmembranen gebildet. Durch Phospholipase A₂ (PLA₂) wird Arachidonsäure z.B. aus Phospholipiden freigesetzt und durch einer der Cyclooxygenase, durch die 5-Lipoxygenase oder durch das Cytochrom P450 System derivatisiert (Abbildung 5). Die so oder durch weitere Umsetzungen gebildeten Eicosanoide sind die bioaktiven Lipide, welche in den unterschiedlichsten Prozessen als Signalmoleküle ihre Wirkung entfalten.^[1]

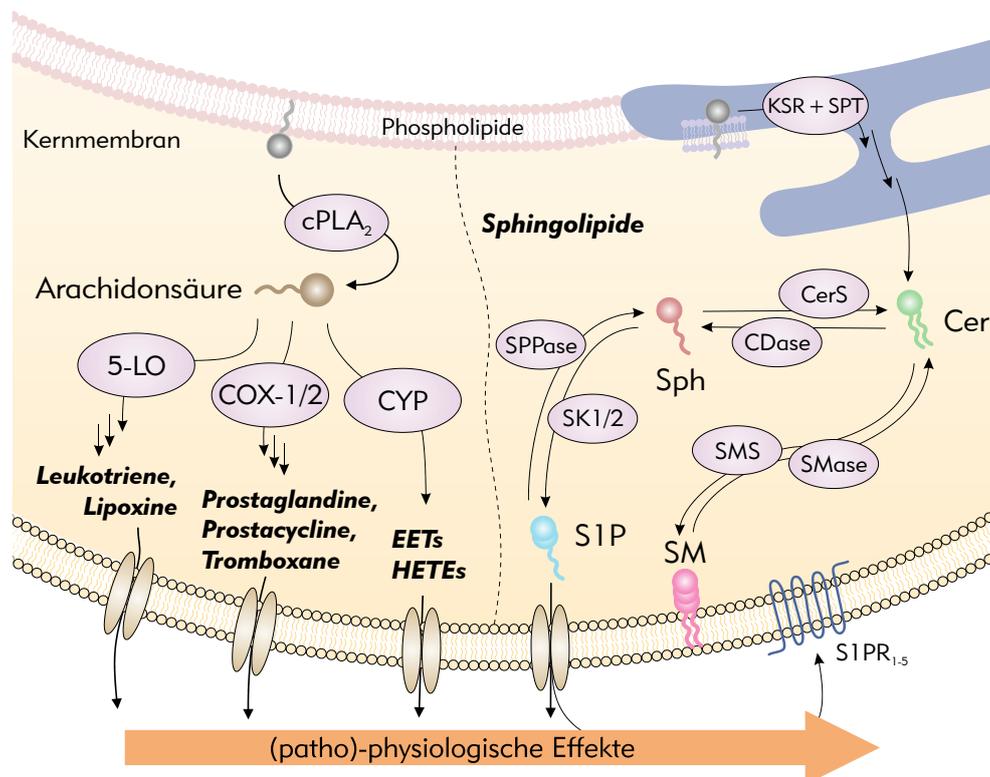


Abbildung 5: Vereinfachte Biosynthese der Eicosanoide und Sphingolipide (stark verändert nach^[31])

Sphingolipide sind zum Teil selbst ein Bestandteil der Zellmembran, z.B. Sphingomyelin (SM). SM kann über Ceramid (Cer) und Sphingosin (Sph), welches auch als Botenstoffe fungiert, zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphoryliert werden, dass durch spezifische Transporter die Zelle verlassen kann und als Botenstoff in zahlreichen Prozessen dient. Im Gegensatz zur Bildung der Eicosanoide ist die der Sphingolipide in fast allen Schritten reversibel. Somit wird die Wirkung einzelner Sphingolipide durch ihren gezielten Auf- und Abbau hervorgerufen. Dennoch wirken beide sowohl in auto- als auch in paracrinere Weise und spielen oft auch in den gleichen Prozessen eine Rolle, z.B. bei Entzündungen.^[14]

2.2 Sphingolipide

2.2.1 Anaboler und kataboler Weg der Sphingolipide

Die Komplexität der Regulationsmechanismen und die Umwandlung der einzelnen Sphingolipide sowie ihre Wirkung als Signalmoleküle bzw. ihre Signalwege sind mit den anderen Signalkaskaden vergleichbar. Die zellulären Konzentrationen der Sphingolipiden werden durch ihren Auf- und Abbau spezifisch reguliert.^[23] Die grundlegende Bedeutung der Sphingolipide als Signalmoleküle, vor allem die der drei wichtigsten Vertreter dem Ceramid (Cer), Sphingosin (Sph) und Sphingosin-1-phosphat (S1P), wird durch ihr Vorkommen in hohen und nieder entwickelten Lebensformen deutlich. Sie finden sich in Pflanzen, Würmern, Fliegen, Schimmelpilze und Hefen, was ihre essentielle Rolle als Signal- und Regulatormoleküle bestätigt.^[23,32] Das vielschichtige Netzwerk der Sphingolipide beginnt mit der *de novo*-Synthese und endet mit dem irreversiblen Abbau von S1P (Abbildung 6).

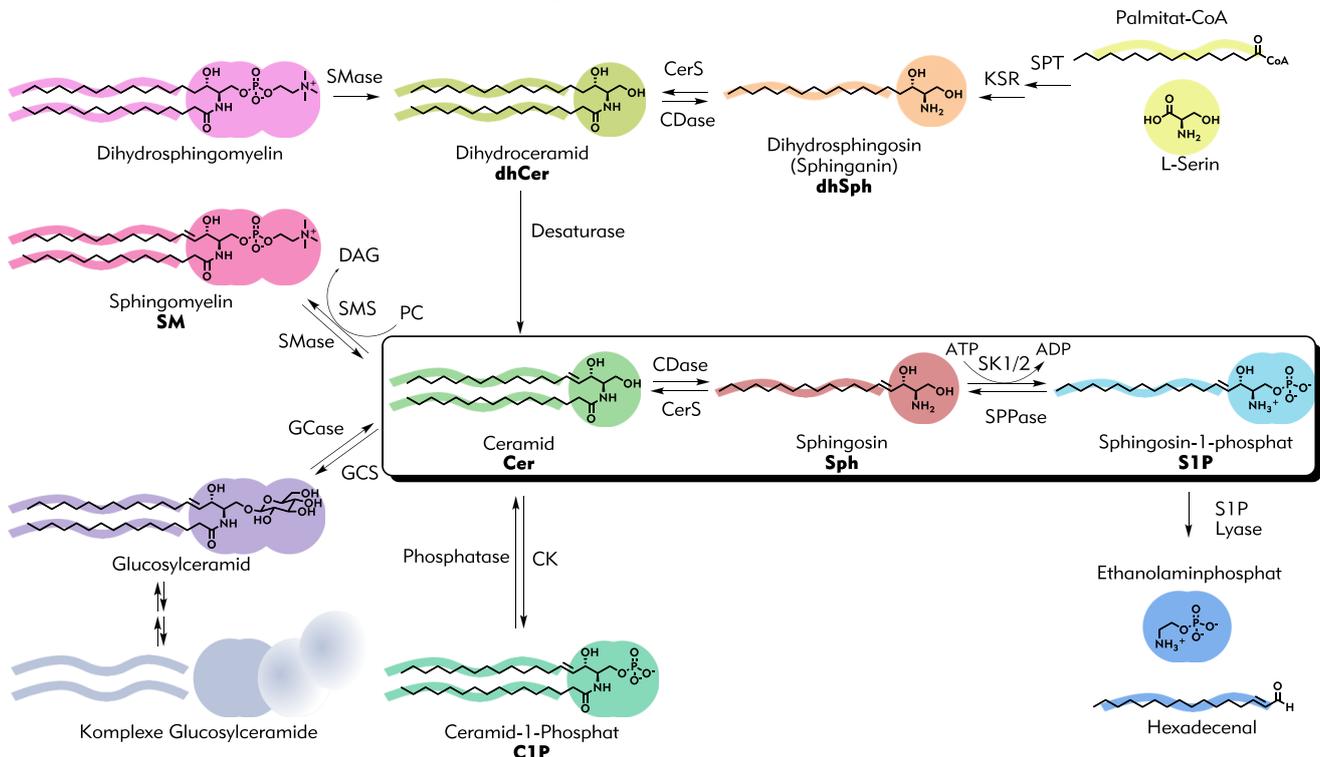


Abbildung 6: Sphingolipid-Stoffwechsel: CDase: Ceramidase, CerS: Ceramidsynthase, CK: Ceramidkinase, DAG: Diacylglycerol, GCase: Glycosylceramidase, GCS: Glycosylceramidsynthase, KSR: 3-Ketosphinganine-reduktase, PC: Phosphatidylcholin, SK: Sphingosinkinase, SMase: Sphingomyelinase, SMS: Sphingomyelinsynthase, SPPase: Sphingosinphosphat Phosphatase, SPT: Serin-Palmitoyltransferase^[23,26]

Im ersten Schritt des Sphingolipid-Stoffwechsels, der im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet, werden L-Serin und Palmitat-CoA durch die Serin-Palmitoyltransferase (SPT) zu 3-Ketodihydrosphingosin (nicht gezeigt in Abbildung 6) kondensiert. 3-Ketodihydrosphingosin wird sofort durch die 3-Ketosphinganine-reduktase (KSR) zu Dihydrosphingosin (dhSph, Sphinganine) reduziert, welches das sphingoide Grundgerüst aller Sphingolipide bildet. DhSph wird reversibel durch Ceramidsynthase (CerS/Lass) zu Dihydroceramid (dhCer) N-acyliert, wobei die Acylierung mit Fettsäuren verschiedener Kettenlängen (C16-C22), je nach Präferenz der verschiedenen Ceramidsynthasen, erfolgen kann. Die verschiedenen dhCer erweitern somit auch die entsprechenden Ceramide, Ceramid-1-Phosphate (C1P) und Myeline um Derivate mit verschiedenen Kettenlängen, was zur Gesamtkomplexität der Sphingolipidnetzwerks beiträgt, da vor Allem Cer und C1P ebenfalls wichtige Signalmoleküle sind. Das C16-Dihydroceramid^[32,33] und die entspre-

chenden C16-Metabolite stellen jedoch die am häufigsten erforschten und vermutlich die wichtigsten Vertreter dar, weshalb in Abbildung 6 und im Folgenden keine weitere Unterscheidung getroffen wird. ^[23,26]

Der Ceramid-Vorläufer dhCer kann außerdem noch durch den Abbau von Dihydrospingomyelin aus der Membran durch die neutrale Sphingomyelase (SMase) gebildet werden. DhSph wird dann irreversibel durch eine Desaturase, unter Einführung einer *trans*-4,5-Doppelbindung, in Ceramid umgewandelt, das ebenfalls eine Rolle im Sphingolipid-Stoffwechsel einnimmt. ^[23,26]

Der Abbau von Sphingomyelin (SM), das sich hauptsächlich in Zellmembranen findet, durch eines der drei Sphingomyelinase-Isoenzyme (SMase) stellt neben dem *de novo*-Pfad ein weiteres Reservoir an Ceramid dar. SM seinerseits wird ausgehend von Ceramid und einer Phosphatidylcholin-Gruppe (PC) durch die Sphingomyelin-Synthase (SMS) aufgebaut, wobei dies hauptsächlich im Golgi Apparat stattfindet. Die Glucosylceramid-Synthase (GCS) kann Ceramid mit Glucose verbinden und stellt somit den Ausgangspunkt für die anderen, komplexeren Glucosylceramide dar. Glucosylceramid wird dann mit anderen Zuckern zu den komplexeren Glucosylceramiden (u. a. den Gangliosiden) verknüpft, die durch Glucosylceramidasen (GCase) aus diesen Zuckerkonjugaten auch wieder Ceramid freisetzen können. ^[23,26]

Ceramid, welches eine zentrale Substanz im Sphingolipid-Gleichgewicht (*rheostat*) einnimmt, kann durch die Ceramidkinase (CK) zum Ceramid-1-Phosphat (C1P) phosphoryliert werden. Weit bedeutender ist die Deacylierung durch die Ceramidase (CDase) zu Sphingosin (Sph). C1P und Sphingosin sind beide wieder in Ceramid umwandelbar - C1P durch Phosphatasen und Sphingosin durch Ceramidsynthasen (CerS). Sphingosin wird durch einer der beiden Sphingosinkinasen (SK1/SK2) zum wichtigsten Signalmolekül des Sphingolipidsystems, dem Sphingosin-1-phosphat (S1P), phosphoryliert. Die Rückreaktion, die Abspaltung des Phosphats, erfolgt durch eine der Sphingosinphosphat-Phosphatase (SPPase1/SPPase2), wobei man den Abbau von S1P zu Ceramid als Recycling- oder *salvage*-Weg bezeichnet. Die jeweiligen Isoenzyme des S1P Auf- und Abbaus besitzen dabei unterschiedliche Lokalisationen (s. Abbildung 8).

In dem komplexen, anabolischen und katabolischen Stoffwechsel ist mit dem irreversiblen Abbau von S1P zu Ethanolaminphosphat und Hexadecenal durch die Sphingosin-1-phosphat-Lyase (S1P-Lyase) ein Endpunkt bzw. eine S1P-Senke erreicht. ^[23,26]

2.2.2 Konzentrationsabhängige Vernetzung

Betrachtet man den Sphingolipid-Metabolismus mit seinen ineinandergreifenden und miteinander verbundenen, zum größten Teil reversiblen Schritten (Abbildung 6), ist es offensichtlich, dass eine Veränderung an einer Stelle des Netzwerkes Veränderungen an einer Anderen auslösen kann. Das System wird unter Berücksichtigung der relativen Konzentration der einzelnen Sphingolipide zu einander noch weitaus sensibler für bestimmte Umwandlungen und Veränderungen. Dieses Verhalten ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. ^[23,26]

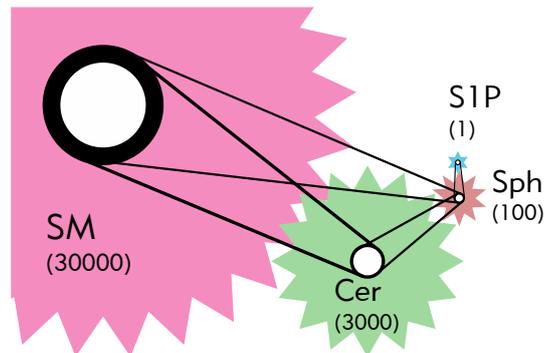


Abbildung 7:^[26] Zahnradmodell der Sphingolipide Sphingomyelin (SM), Ceramid (Cer), Sphingosin (Sph) und Sphingosin-1-phosphat (S1P); in Klammern relative, „zelluläre“ Konzentrationsverhältnisse^[23]

Das Zusammenspiel der Sphingolipide wird maßgeblich durch deren jeweilige Konzentrationen bestimmt. SM ist in den meisten Zellen in einer um eine Zehnerpotenz höheren Konzentration vorhanden als Ceramid (s. Zahlen in Klammern in Abbildung 7). Folglich bewirkt der Auf- oder Abbau geringer Mengen von SM eine weitgreifende Veränderung der Ceramid-Konzentration. Die S1P-Konzentration wiederum ist um fast drei Größenordnungen geringer als die an Ceramid. Dies bedeutet, dass sich die Menge an Sphingosin verdoppelt, wenn nur ca. 5% von neu gebildetem Ceramid sofort durch Ceramidasen zu Sphingosin hydrolysiert werden. Eine verstärkte Phosphorylierung von Sphingosin wirkt sich ähnlich drastisch auf die S1P Konzentration aus. Die S1P-Konzentration steigt um den Faktor zwei, wenn nur 1% Sphingosin phosphoryliert wird. ^[8,23]

2.2.3 Sphingolipid-Stoffwechsel in der Zelle

Als lipophile Moleküle, mit einer hydrophilen Kopfgruppe werden Sphingolipide bevorzugt in oder an zellulären Membranen umgewandelt. Ceramid wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. an ER-assoziierten Membranen über den *de novo*-Weg aus L-Serin und Palmitoyl-CoA synthetisiert **[1]** in Abbildung 8). Durch spezifische Transportproteine (CERT) oder Transportvesikel wird es zum Golgi-Apparat transportiert, wo es durch die Sphingomyelin-Synthase (SMS1)^[34] in SM umgewandelt wird **[2]**. Außerdem wird Ceramid zu Glycosylceramiden glykosyliert, die zum Aufbau der komplexeren Glycosylceramide dienen **[3]**. Zur Synthese der komplexeren Glycosylceramiden, die im Inneren des Golgi auf dessen zytosolischer Seite stattfindet, muss Glycosylceramid über das Transportprotein FAPP2 dorthin gebracht, und mit Hilfe eines spezifischen ABC-Transporters eingeschleust werden (Translokation). FAPP2 führt auch den umgekehrten Transport von Glycosylceramid ins Endoplasmatische Retikulum durch. Das im Golgi gebildete SM und die komplexeren Glycosylceramide werden von Transportvesikel zu den verschiedenen Zellmembranen (Plasma-, Vesikel- und intrazellulären Membranen) befördert **[4]**. ^[8,23,26]

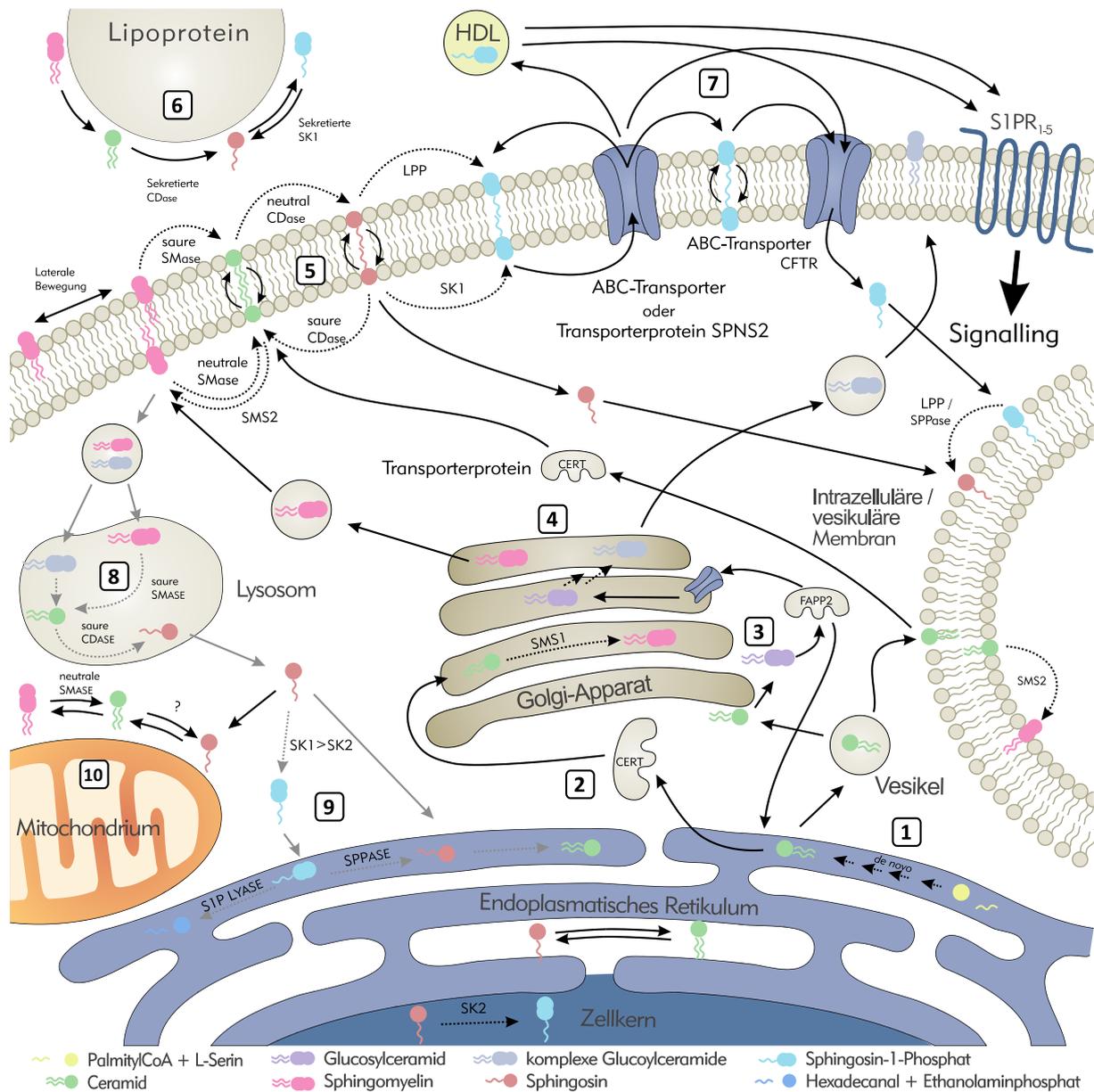


Abbildung 8: Schematische Darstellung (modifiziert nach [23,32]) des Sphingolipid-Stoffwechsels innerhalb Zelle (zu [1] - [10] siehe Text); CDase: Ceramidase, CerS: Ceramidsynthase, CK: Ceramidkinase, DAG: Diacylglycerol, GCase: Glycosylceramidase, GCS: Glycosylceramidsynthase, SK: Sphingosinkinase, SMase: Sphingomyelinase, SMS: Sphingomyelinsynthase, SPPase: Spingosinphosphat Phosphatase, LPP: unspezifische Lipidphosphat-Phosphatasen.

In der Membran befindliches SM, das eine hohe Oberflächenbeweglichkeit aufweist (vgl. Seite 6), kann durch Sphingomyelinasen (SMasen) zu Ceramid abgebaut und durch Ceramidasen (CDase) weiter zu Sphingosin umgesetzt werden [5]. Dieser membranäre Metabolismus wird jeweils durch spezifische Formen der SMase und der CDase katalysiert. Die jeweiligen drei Isoformen der SMase und der CDase unterscheiden sich in ihrem pH-Optimum und dadurch auch in ihren Lokationen. Endozytisches Ceramid kann durch SMS2^[34] wieder in SM umgewandelt werden. Unspezifische Lipidphosphat-Phosphatasen (LPP), welche in der Membran vorkommen, können zudem aus SIP ebenfalls Sphingosin freisetzen.^[8,23,26]

Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften, der kleinen polarer Kopfgruppe und dem langen lipophilen Rest, besitzen Ceramid und Sphingosin die Fähigkeit durch einen *flip-flop*-Mechanismus die Membranseite zu wechseln, wobei sich das gesamte Molekül innerhalb der Membranstruktur dreht. SIP ist, aufgrund seiner Ladung, nur in geringem Maße dazu fähig (vgl. ABC-Transporter).^[23,24]

2.2.3 Sphingolipid-Stoffwechsel in der Zelle

Erythrozyten stellen neben Lipoproteine (HDL, LDL und VLDL), die sekretierte SMase, CDase und sekretierte SK1 enthalten, einen Speicherort für S1P dar und erweitern das Spingolipidnetzwerk auf den Blutkreislauf. Lipoproteine enthalten meist einen sehr großen Anteil SM und Ceramid [6]. Ca. 20% der Gesamtlipidmenge in Lipoproteinen ist SM, wobei die Verteilung in den einzelnen Lipoproteinen leicht variiert - 18% in HDL, 14% in LDL und 12% in VLDL. Plasma-SM ist zu ca. $\frac{2}{3}$ an LDL und VLDL und zu ca. $\frac{1}{3}$ an HDL gebunden. Die Ceramid-Verteilung im Plasma ist prozentual vergleichbar zu der von SM. VLDL und LDL beinhalten ca. 80 % des im Plasma vorhandenen Ceramids, nur ca. 5 % sind an HDL assoziiert.^[8,23,35-37]

Sphingosin wird in der Membran, unter ATP Verbrauch, durch Sphingosinkinase 1 (SK1) zu S1P phosphoryliert. Durch einen ABC-Transporter (ABCA1, -C1, -G2) oder das Transportprotein SPNS2^[38] wird S1P aus der Zelle geschleust [7]. Die spezifischen Transportmechanismen in Erythro- und Thrombozyten sind hingegen noch unbekannt.^[24,39] Für die Freisetzung von S1P aus Thrombozyten wurde eine Abhängigkeit von der Proteinkinase C Aktivierung nachgewiesen.^[39] Exozytisches S1P kann in die Membran eingelagert werden, sich „frei“ auf ihr bewegen und durch einen zweiten ABC-Transporter (CFTR) erneut in die Zelle gelangen. Trotz seiner Ladung kann S1P wie Sphingosin durch das Zellplasma wandern, sich in intrazelluläre Membrane einlagern und als sekundärer Botenstoff fungieren, wobei nur einige Wirkmechanismen bekannt sind.^[24] Außerhalb der Zelle kann S1P mit einem der fünf membranären G Proteingekoppelten S1P-Rezeptor Subtypen (S1PR₁₋₅, S1P₁ früher als EDG-1, S1P₂ als EDG-5, S1P₃ als EDG-3, S1P₄ als EDG-6, S1P₅ als EDG-8 bezeichnet) wechselwirken oder an HDL gebunden werden. Man spricht bei S1P auch von dem sogenannten „*inside-out signalling*“, da es sowohl in der Zelle als auch außerhalb und sogar auf andere Zellen wirken kann. Das „*inside-out signalling*“ ist mitunter der Grund, dass das pleiotrope S1P an so vielen Prozessen beteiligt ist (s. u.).^[8,23,26]

Durch vesikulären Transport gelangen SM und Glycosylceramid von der Membran zum Lysosom, wo sie auf dem Recycling- bzw. *salvage*-Stoffwechselweg durch saure SMasen und Glycosidasen (GCasen) wieder zu Ceramid degradiert werden [8]. Saure CDase können Ceramid weiter zu Sphingosin deacylieren, das dann das Lysosom verlässt und unter anderem von zytosolischen SKs (SK1 und SK2)^[40,41] zu S1P phosphoryliert werden kann [9]. (Extrazellulär ist bisher nur SK1 nachgewiesen worden (vgl. [6])^[42,43] Im ER wird so gebildete S1P durch die S1P-Lyase final zu Hexadecenal und Ethanolaminphosphat abgebaut. Lysomales Sphingosin kann auch direkt ins ER gelangen. Dort wird es von Ceramidasen in Ceramid umgewandelt und kann somit erneut den Zyklus durchlaufen. Es existieren außerdem Hinweise, dass die Umwandlung von Sphingosin zu Ceramid und weiter zu SM und die entsprechenden Rückreaktionen ebenfalls in Mitochondrien ablaufen [10].^[8,23,26]

2.2.4 Balance zwischen Ceramid-Sphingosin-S1P: (patho)- / physiologische Wirkung

Die Wirkung, die bioaktiven Sphingolipide auf den Organismus bzw. auf einzelnen Organ, Enzyme oder Enzymkaskaden haben, wird durch ihre physiologischen Konzentrationen bestimmt (vgl. Abbildung 7). S1P, das nur in mikromolaren Konzentrationen vorkommt, wechselwirkt mit hochaffinen Rezeptoren (S1PR₁₋₅), die in der Lage sind diese niedrigen Konzentrationen wahrzunehmen (K_i -Werte: Tabelle 1). Ceramid, das bis zu 1% der Membranlipide ausmacht, ist in höheren Konzentrationen vorhanden und wechselwirkt bzw. wirkt auf Zielmoleküle, die in diesem Konzentrationsbereich empfindlich sind. Sphingomyelin ist als Membranbestandteil allgegenwärtig und dient als Vorläufer für diese hochaffinen Botenstoffe. Es gibt allerdings Hinweise, dass SM ebenfalls ein spezifisches Substrat für bestimmte Proteine oder Enzyme sein könnte. Wesentliche Veränderungen der SM-Konzentration bewirken jedoch Veränderungen der physiochemischen Eigenschaften von Membranen (*lipid rafts*).^[8,23,26]

Schon früh wurde erkannt, dass S1P, Sphingosin und Ceramid einen erheblichen Einfluss auf das Überleben bzw. den Tod von Zellen ausüben, wobei S1P und Ceramid häufig entgegengesetzte Wirkung haben. S1P wirkt antiapoptotisch wohingegen Ceramid die Apoptoserate steigert. Obwohl S1P selbst keine tumorogene Substanz ist, besitzt es tumorfördernde Eigenschaften. Es weist vielmehr eine proliferative Wirkung auf, indem es die Angiogenese unterstützt und Zellmigration auslöst. Hingegen steigern hohe Konzentrationen an Ceramid die Apoptoserate, drosseln das Zellwachstum, beeinflussen die Zellalterung und wirken zudem pro-inflammatorisch. Aus diesem Grunde können Ceramide zur Unterstützung in der Bestrahlungstherapie im Zuge einer Krebsbehandlung eingesetzt werden. Aus diesen Beobachtungen und der Überführbarkeit von S1P und Ceramid (über Sphingosin) leitet sich die Vermutung ab, dass nicht primär die Kon-

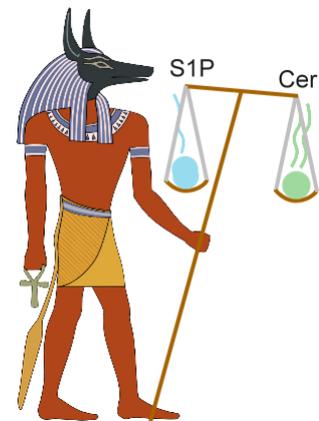


Abbildung 9:^[44] Totengott Anubis mit Waage, die über das ewige Leben oder den Tod entscheidet.

zentrationen an S1P und Ceramid über das Schicksal der Zelle entscheiden, sondern viel mehr deren Verhältnis (Abbildung 9). Dies wiederum hängt von ihrem Auf- und Abbau bzw. von der Aktivität der involvierten Enzyme ab, wobei den Sphingosinkinasen (SK), besonders SK1, dabei eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird. Knock-out-Experimente konnte zeigen, dass SKs zu den lebenswichtigen Enzymen gehören. Werden beide Isoenzyme (SK1 und SK2) ausgeschaltet, führte dies im Mausversuch zum Tod des Embryos, wohingegen sich Mäuse mit nur einer SK normal entwickeln und Kompensationseffekte zu beobachten sind. Stimuliert wird SK1 durch verschiedene Wachstumsfaktoren (PDGF, VEGF, EGF), Zytokine (TNF α ((Tumornekrosefaktor α))), Estradiol und S1P selbst. Aktiviert bzw. reguliert wird SK1 u. a. durch ERK2-Phosphorylierung.^[4,8,40,45]

Die beiden SKs unterscheiden sich sehr stark in ihrer zellulären (vgl. Abbildung 8) und Gewebeverteilung. Während SK1 vorwiegend in der Lunge, der Milz, den Nieren und im Blut (Thrombozyten)^[46] exprimiert wird, wird SK2 vorwiegend in der Leber, den Nieren, im Gehirn und im Herz exprimiert.^[40] Außerdem finden sich beide Isoenzyme im Zentrosom, wo sie unter anderem durch Steuerung der S1P- und Sphingosinkonzentration die Regulation der Mitose beeinflussen.^[47] Dabei konnte gezeigt werden, dass der Zellzyklus und die DNS-Synthese durch erhöhte SK1- und S1P-Konzentrationen beschleunigt wird. Hohe Konzentrationen an SK1 erhöhen das Zellwachstum, was im Mausversuch zur Tumorbildung führte. Im Falle von Krebserkrankungen, die sich durch erhöhtes Zellwachstum auszeichnen, konnte schon früh eine Störung des Sphin-

golipid-Metabolismus nachgewiesen werden.^[8] Antikörper gegen S1P und SK-Inhibitoren stellen hier einen neuartigen Therapieansatz zur Krebsbehandlung dar. Sie senken die S1P-Konzentration und verlangsamen somit das S1P-induzierte Tumorstadium bzw. die für das Überleben und die Ausbreitungen wichtige Angiogenese.^[48]

Sphingosin-1-Phosphat

S1P übt seine Effekte nicht nur durch die G Protein-gekoppelten Rezeptoren (vgl. Kristallstruktur S. 34 und 2.2.5 S1P-Rezeptoren) und die nachgeschaltete Signalkette aus, sondern es fungiert auch direkt als second Messenger, wobei vieler dieser Effekte noch nicht bekannt sind.^[24] Zu diesen direkten S1P-Effekten gehört vermutlich die Regulation der Histondeacetylasen (HDAC1 und HDAC2) (S1P wird im Zellkern durch SK2 gebildet). HDACs entfernen Acetylgruppen von Histonen, welche dann an die DNS binden und deren Ablesen verhindern. S1P wirkt somit direkt auf molekularer Ebene im Zellkern. Es beeinflusst die Genexpression, die Proteinbiosynthese und die Zellteilung.^[4,49,50]

Vielen der durch Sphingolipide vermittelten Effekte liegt einer der oben genannten Effekte oder ähnliche Signalwege zugrunde.^[32] S1P ist ständig in relativ hoher Konzentration in den Körperflüssigkeiten vorhanden, wohingegen im Blutplasma die Konzentration im Bereich von 0.2 bis 0.9 μM , im Serum zwischen 0.4 und 1.1 μM liegt. In den Geweben hingegen ist die Konzentration niedrig - hier sind nur S1P-Konzentrationen von 0.5 bis 75 pmol/mg messbar. S1P ist bevorzugt an Albumin und Lipoproteine, insbesondere an HDL (ca. 65% des gesamten Plasma S1P)^[38], gebunden und zirkuliert nicht in freier Form. Dies stellt ein gut verfügbares Reservoir dar, das durch die Expression von SKs schnell abgerufen werden kann. Es gibt einige Hinweise, dass gebundenes S1P dennoch bioaktiv ist, da es sehr schnell von und zu HDL dissoziieren kann.^[8]

Das S1P im Blut stammt aus verschiedenen Quellen, wobei es hauptsächlich in Erythrozyten gebildet wird. Erythrozyten dienen zudem als S1P-Speicher, da sie die keine S1P-Lyase und keine SPPasen besitzen.^[50] Bei Aktivierung (u. a. durch Serumalbumin) können sie S1P durch Ausschleusung über ABC-Transporter schnell zur Verfügung stellen.^[48] Die hohe Konzentration von S1P in Erythrozyten ist neben der Phosphorylierung von Sphingosin durch SK1/2 auch auf deren S1P-Aufnahmefähigkeit zurückzuführen. Thrombozyten und Endothelialzellen sind hingegen nur in sehr geringem Maße zur Speicherung von S1P befähigt. Aufgrund von Stress (laminarer Schubstress) schütten Endothelialzellen S1P aus, wobei sie auch von S1P aus Thrombozyten zur Sekretion angeregt werden. Thrombozyten und Mastzellen sekretieren S1P dabei nur nach vorheriger Stimulation. Sie spielen eine tragende Rolle im S1P-Gleichgewicht in pathophysiologischen, entzündlichen Prozessen, da sie die Konzentration nur lokal verändern und nicht zum Erhalt des Gesamt-S1P-Gleichgewichts beitragen.^[8,26,47,48,51,52]

Die Dephosphorylierung von S1P durch SPPasen ist neben den SKs, die die Neubildung von S1P kontrollieren, ein entscheidender Faktor, der die S1P-Konzentration beeinflusst. Die Überexpression von SPPasen führt durch die Anreicherung von Ceramid zu einer erhöhten Apoptoserate, wohingegen deren Inhibition die S1P-Konzentration steigert. Vor Allem extrazellulär kann S1P auch durch unspezifische Phosphatasen (LPPs) dephosphoryliert werden. Die S1P-Menge wird ferner durch den irreversiblen Abbau durch die S1P-Lyase reguliert. Die gleichzeitige Blockierung von SPPasen und S1P-Lyasen führt neben dem Ansteigen der S1P-Konzentration zur Steigerung der Prostaglandinsynthese.^[4,23] SPPasen und S1P-Lyase sind ER lokalisiert, wobei sich die S1P-Lyase in großen Mengen in der Thymusdrüse, der Milz, der Leber und dem Darm findet. SPPase1 und 2 haben unterschiedliche Lokationen: SPPase1 vornehmlich in der Plazenta

und den Nieren, SPPase2 im Gehirn, im Herz, im Dün- und Dickdarm und in den Nieren.^[23] SPPasen und S1P-Lyase könnten, wie auch alle andere im Sphingolipidabbau involvierten Enzyme, ein therapeutisches Target bei der Behandlung von Multipler Sklerose (MS), rheumatoider Arthritis, neurodegenerativen Krankheiten und Krebserkrankung sein, da sie entscheidend den S1P-Spiegel beeinflussen, der bei diesen Erkrankungen gestört ist.^[26,32] In einigen Fällen könnte der S1P-Spiegel selbst ein nützlicher, diagnostischer Marker sein. Bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten und bei allergeninduzierten Asthmatikern oder bei rheumatoider Arthritis ist die Konzentration an zirkulierenden S1P stark erhöht.^[47]

Ceramid und Sphingomyelin

Die Regulation der Ceramide zeichnet sich durch eine höhere Komplexität aus, da sie durch die Aktivität von mehreren Enzymen gesteuert wird (vgl. Abbildung 6). Zudem präferieren die verschiedenen Ceramidsynthasen (CerS/Lass) Fettsäure-CoAs mit verschiedenen Kettenlängen (C16-C20), weshalb es nicht „das Ceramid“ gibt. Die *de novo*-Synthese und der Abbau von SM zu Ceramid beeinflussen maßgeblich die Ceramid-Konzentration, wobei hohe Konzentration an L-Serin und Palmitat die *de novo*-Synthese steigern. Dem regulierende Verhalten des Palmitat wird zudem eine entscheidende Rolle bei Diabetes Mellitus bzw. dem Insulinstoffwechsel und dem Metabolischen Syndrom zugeschrieben.^[23,45] Durch Inhibition von SK1 steigt die S1P-Konzentration und bewirkt einen pro-apoptischen Anstieg der Ceramid-Konzentration. Diese Wirkung kann ebenfalls durch Behandlung mit Ceramidase-Inhibitoren ausgenutzt werden. In Krebszellen kann so die Konzentration an Ceramid erhöht werden, wohingegen sie in gesunden Zellen unverändert bleibt und somit gezielt Krebszellen in die Apoptose getrieben werden können.^[53,54] Stoffe, die die Umwandlung von Ceramid, Sphingosin oder S1P regeln, können über das Überleben der Zelle entscheiden, da sie die Balance des Ceramid-Sphingosin-S1P Gleichgewicht beeinflussen.^[4,26,45]

Der Abbau von SM zu Ceramid durch SMasen ist umfangreicher erforscht als die Umsetzung von Sphingosin durch CerS. Die Expressionsmustern der drei SMase-Klassen (saure, neutrale und alkalische) unterscheiden sich wesentlich. Die sauren und die neutralen SMase kommen nahezu ubiquitär in allen Geweben vor (im Gehirn hauptsächlich neutrale). Sie unterscheiden sich jedoch stark in ihre zelluläre Verteilung (saure: lysosomal, extrazellulär durch Sekretion; neutrale: membranär im ER, Golgi-Apparat, Zellkern). Die alkalische SMase hingegen kommt fast ausschließlich in der Galle vor und sorgt für die Verdauung von SM. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Familie der Nukleotide-pyrophosphatase / Phosphodiesterase (NPP) wurde die alkalischen SMase in NNP7 umbenannt.^[45] Die Aktivierung der sauren SMasen erfolgt unter anderem durch oxidativen und thermischen Stress, Stressfaktoren und pro-inflammatorische Zytokine. Innerhalb von Minuten reagiert die sauren SMasen auf ultraviolette / ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika wie Platinverbindungen, Paclitaxel und Histondeacetylase-Inhibitoren, die die Menge an Ceramid ansteigen lassen, was zum Zelltod führt. Die Aktivierungsfaktoren der neutralen SMasen entsprechen in etwa denen der sauren SMasen.^[23,26,55,56]

Oxidiertes LDL, das in der Entstehung und Entwicklung von Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielt, induziert auch den Abbau von SM und führt somit einer Zunahme von Ceramid. Die erhöhte Ceramid-Produktion ist ein bedeutender Faktor für Apoptose.^[45,57] SM beeinflusst unter anderem die Absorption von Cholesterin. Im Dünndarm wird die Aufnahme von Cholesterin durch Sphingolipide gehemmt, wodurch der Plasmacholesterinspiegel sinkt. Dies ist im Zusammenhang mit der Entwicklung von Medikamenten gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen interessant.^[58] Die Daten über den Einfluss von Sphingolipide auf Arteriosklerose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind allerdings kontrovers.^[57,59]

Die fortschreitende Ablagerung von Amyloid- β -Peptiden (A β) in Neuronen charakterisiert das Krankheitsbild von Alzheimer. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten ist eine Akkumulation an langkettigen Ceramiden und Cholesterin im Hippocampus feststellbar.^[60] Der erhöhte Gehalt an Ceramid könnte die synaptische Funktionsstörung und den Tod von Nervenzellen auslösen. Die Senkung des Gehalt an SM durch SMase oder CerS Inhibitoren kann dem entgegenwirken.^[24,33,56,61]

Ceramid-1-Phosphat (C1P) ist ein weiteres wichtiges intrazelluläres Signalmolekül, das einen ähnlichen Signalweg bzw. Wirkungsweise wie S1P aufweist. Es reguliert die Zellproliferation und Apoptose und ist zudem pro-inflammatorisch wirksam. C1P wird im Golgi Apparat gebildet und verlässt das Zellinnere, um seine Wirkung zu entfalten. Die Wirkung als potenter Apoptoseinhibitor kann unter anderem auf die Inhibition der saure SMase und damit verbundene Verringerung der Ceramid-Konzentration zurückgeführt werden. Die pro-inflammatorische Wirkung von C1P kann auf die direkte Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) zurückgeführt werden, wobei C1P auch deren Translokation bewirkt.^[62] Hohe cPLA₂-Aktivität bewirkt eine erhöhte Arachidonsäurefreisetzung und damit eine Aktivierung der Arachidonsäurekaskade. Die Erhöhung der Prostaglandinproduktion wird dabei auch durch ein Zusammenspiel aus S1P und C1P verursacht. Neben diesem direkten Beeinflussung des Prostaglandinstoffwechsels spielt C1P auch eine Rolle in der Stimulation der Phagozytose in Neutrophilen, der Aktivierung der Mastzelldegranulation und der Stimulation der Makrophagenmigration, weshalb Ceramidkinase-Inhibitoren in der Allergietherapie eingesetzt werden können.^[10,45]

Das Fehlen der jeweiligen, distinkten Enzyme zum lysosomalen Abbau der Sphingolipide, vor allem der komplexeren Glycosylceramide, ist mit einer Stoffwechselkrankheiten verbunden, die sich vorwiegend im zentralen Nervensystem zum Ausdruck kommt: Sphingolipidosen sind die Niemann-Pick-Krankheit (saure Sphingomyelinase), die Fabry'sche Erkrankung (α -Galactosidase A SAP B), die Sandhoff'sche Erkrankung (β -Hexosaminidase A,B), die Gaucher'sche Erkrankung (Glucosylceramidase SAP-C), die Farber'sche Erkrankung (saure Ceramidase), die Krabbe'sche Erkrankung (β -Galactosylceramidase) und die metachromatische Leukodystrophie (Arylsulfatase A). Die oben aufgeführten Sphingolipidosen werden mit Ausnahme der Fabry'schen Erkrankung autosomal rezessiv vererbt.^[26,58]

2.2.5 S1P-Rezeptoren

Die S1P-Rezeptoren zählen zur Klasse der membranären Lysophospholipidrezeptoren und somit zur großen Familie der rhodospinähnlichen Rezeptoren (Unterfamilie A13). Zu den Lysophospholipidrezeptoren zählen neben den S1P-Rezeptoren die sechs LPA-Rezeptoren, deren natürliches Substrat Lysophosphatsäure (LPA) ist. LPA- und S1P-Rezeptoren wurden früher als Edg (*endothelial differentiation gen*) Rezeptoren bezeichnet. Wie auch alle anderen GPCRs weisen die S1P-Rezeptoren sieben transmembranäre Helices auf, deren strukturelle Anordnung bei allen Subtypen konserviert ist. Bisher liegt nur vom S1P₁-Rezeptor eine Kristallstruktur vor (s. Abbildung 23, Seite 34).^[63,64]

2.2.5.1 G Proteinkopplung und pharmakologische Charakterisierung

Der größte Teil der S1P-Effekte scheint durch Stimulation der fünf S1P-Rezeptorsubtypen und der damit verbundenen G Proteinkopplung ausgelöst zu werden. Außer dem S1P₁-Rezeptor zeigen alle anderen eine hohe Promiskuität (s. Abbildung 10) in ihrer G Proteinkopplung, die die Komplexität der rezeptorgesteuerten Effekte erhöht bzw. gegenseitig beeinflusst. Dabei kann die Kopplung einzelner Rezeptoren sogar innerhalb eines Zelltyps variieren. Die Aktivierung der downstream Enzyme ist jedoch trotz gleicher Kopplung, nicht immer gleich stark. S1P₂ ist ein weitaus weniger starker ERK-Aktivator als S1P₁ und S1P₃, obwohl sie alle G_{i/o} gekoppelt sind.^[37,65]

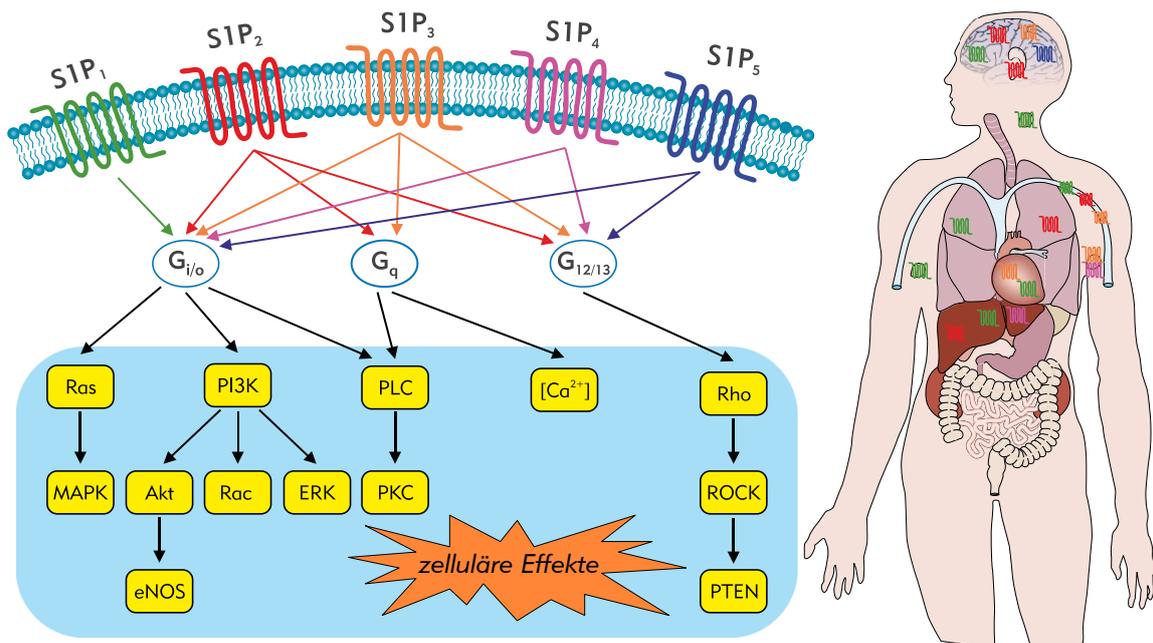


Abbildung 10: G Proteinkopplung der S1P-Rezeptoren und damit verbundene downstream Enzymen, sowie Rezeptorsubtypenverteilung im menschlichen Körper^[27,38]

Rezeptorgesteuert nimmt S1P unter anderem Einfluss auf Zytoskelettveränderungen, Zellmobilität und -bewegung und Adhäsion, Blutgefäße (Angiogenese), Gefäßtonus, Herzfunktion und Gefäßpermeabilität, Immunantwort bzw. auf Lymphozyten.^[23] S1P stellt einen wichtigen Mediator bei einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen, Organtransplantationen, Tumorerkrankungen, Infertilität der Frau, myokardialen Infarkt, entzündlichen Gefäßkrankungen oder bei Multipler Sklerose dar. Die fünf G Protein-gekoppelten Rezeptoren kommen ubiquitär vor, unterscheiden sich jedoch stark hinsichtlich ihrer Expressionsmuster, wobei die meisten Zellen mehr als einen S1P-Rezeptorsubtyp exprimieren. Die Affinität für S1P und die jeweiligen Signalkaskade ist ebenfalls unterschiedlich (s. Tabelle 1).^[8,23,32,37,65]

2.2.5.1 G Proteinkopplung und pharmakologische Charakterisierung

Tabelle 1: S1P-Rezeptorsubtypen und ihre pharmakologische Charakterisierung^[8,23,26,37,47,63,66]

Bezeichnung (alter Name)	K _i -Wert S1P [nM]*	GPR- und Signal- koppl.	Gewebeverteilung	Physiologische Effekte	Lokalisation (Effekt)	Knock-out Phänotyp (Maus)
S1P₁ (EDG-1)	0.47 ± 0.34	G _{i/o} AC↓, ERK↑, PLC↑, eNOS↑, Rac ↑, Rho ↑, PI3K/Akt↑	Ubiquitär: Nieren, Herz, Lymphknoten / Thymusdrüse (T- Zellen, B-Zellen, natürliche T-Killer- zellen, dendritische Zellen, Mastzellen), Makrophagen, Lunge, Gehirn, Milz, Leber, Skelett- muskeln	Zellbeweg- lichkeit, Lymphozyten- wanderung, Angiogenese, Gefäßreifung, endotheliale Entwicklung, Herzfrequenz, Blutgefäßer- weiterung, Neurogenese	Niere (Austritt von Gefäßflüssigkeit, Entzündung); Herz (Entzündung, Cardiomyozyten); Lymphknoten (Sekretion und Bewegung der Lymphozyten); Lunge (Austritt von Flüssigkeit, Entzündung, Atemwegssensibilität); Blutgefäße im Gehirn (endotheliale Permeabilität, Transport zw. Zellen); Gehirn (Migration von Astrozyten); Endothelzellen (Entwicklung des Gefäßsystems, Zellzusammenhalt, Permeabilität); Neuronale Stammzellen (erhöhte Migration); Perizyten (Entwicklung des Gefäßsystems); Glatte Gefäßmuskelzellen (Entwicklung des Gefäßsystems)	Embryonale Sterblichkeit (Blutgefäßaus- bildung und Zellmigration bei der Zell- wandsynthese gestört). In bestrahlten Chimären können Null- thymozyten nicht mehr auswandern.
S1P₂ (EDG-5)	0.31 ± 0.02	G _{i/or} G _{qr} G _{12/13} AC ↓, PLC ↑, JNK ↑, p38 ↑, Rho ↓, Rac ↓	Ubiquitär: Herz, Lunge, Gehirn, Milz, Leber, Nieren, Skelett- muskeln, Thymus- drüse (dendritische Zellen, Mastzellen, Makrophagen, glatte Gefäßmuskel- zellen)	Inhibiert Bewe- gung und Proliferation, neuronale Anregung, Gehör	Herz (Cardiomyozyten, Blutgefäßerweiterung) Lunge (Austritt von Flüssigkeit, Entzündung, Atemwegssensibilität); Blutgefäße im Gehirn (Transport zw. Zellen, Gehör, Gleichgewicht); Cardiomyozyten (Heilung nach chemischer Ischämie Reperfusion); Endothelzellen der Stria vascularis (Funktion, Entwicklung); Epitheliale Haarzellen der Cochlea (Funktion, Entwicklung); Endothelzellen der Retina (pathologische Angiogenese, Zellverbund); Hepatozyten (Proliferation, Grundsubstanz rekonstruieren); Fibroblasten, Mastzellen (Degranulation); Glatte Gefäßmuskelzellen (verminderte PDGF-induzierte Migration)	Taubheit, reduzierte Viabilität, Krämpfe bedingt durch genetischen Hintergrund
S1P₃ (EDG-3)	0.17 ± 0.05	G _{i/or} G _{qr} G _{12/13} AC↓, ERK↑, PLC↑, Rac ↑, Rho ↑	Herz, Lunge, Milz, Nieren, Lymphknoten (T-, B-Zellen, dendritische Zellen), Thymusdrüse, Darm, Zwerchfell, Knorpel, Gehirn, Milz, Skelettmus- keln, Hoden bzw. Scheidenwand	Bradykardie, pulmonale Epithelial- barriere, Gehör	Herz (Herzfrequenz, Myocyten, Entzündung, Blutgefäßerweiterung) Lunge (Entzündung, Atemwegssensibilität) Lymphknoten (dendritische Zellabsekretion) Blutgefäße im Gehirn (Gehör, Gleichgewicht) Cardiomyozyten (Heilung nach Ischemia Reperfusion) Dendritische Zellen im Blut (Verschlechterung bei experimenteller Sepsis, Letalität, Entzündung, Koagulation)	Verschlech- terte Ergebnis- se bei Sepsis, reduzierte Viabilität
S1P₄ (EDG-6)	95 ± 25	G _{i/or} G _{12/13} ERK↑, PLC↑	Immunzellen (T-, B- Zellen, dendritische und natürliche Killerzellen), Leuko- zyten, Lymphsystem, Lunge	Zytokine	T-Zellen (Migration, Sekretion durch Zytokine)	
S1P₅ (EDG-8)	0.61 ± 0.39	G _{i/or} G ₁₂ AC↓, ERK ↓, JNK ↑, p54JNK ↑	ZNS, dendritische und natürliche Killerzellen, Milz, Haut	Zellbewegung	natürliche Killerzellen (Wanderung); Oligodendrozyten (Überleben); Oligodendrozyten Vorläuferzellen (<i>Gliazellen Prozessrückzug</i> , Inhibierung der Migration)	Keine offen- sichtlichen Phänotypen

*in CHO-Zellmembranen exprimiert, gemessen durch kompetitive Bindung von [³³P] S1P^[67]

2.2.5.2 Rezeptor vermittelte SIP Effekte: (patho)-/physiologische Wirkung

SIP und seine Rezeptoren nehmen erheblichen Einfluss auf die Gefäßentstehung im Körper. Vor allem die SIP_1 -, SIP_2 - und SIP_3 -Rezeptoren spielen im kardiovaskulären System tragende Rollen. Das Fehlen des SIP_1 -Rezeptors bei Mäusen (*knock-out*) führt schon im embryonalen Stadium (nach ca. 2/3 der Gravidität) zum Tod. Aufgrund der gestörten, SIP_1 -vermittelten Zellmigration kommt es zu Missbildungen des Blut- und des Gefäßsystems. Zudem wird vermutet, dass sowohl der SIP_2 - und SIP_3 -Rezeptor einen beachtlichen Einfluss auf die Gefäßfunktion und Hämodynamik des Blutes haben, obwohl der alleinige *knock-out* von SIP_2 oder SIP_3 die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht beeinträchtigt, was für eine gewisse Kompensation spricht.^[68] SIP_2 *knock-out* Mäuse verlieren jedoch wenige Wochen nach der Geburt ihre räumliche Orientierung und ihren Gehörsinn.^[26,65,69]

In vitro-Untersuchungen zeigen, dass SIP in Folikularflüssigkeit endotheliale Progenitorzellen stimuliert und die ovariale Angiogenese vorantreiben kann. Die im Gefäßsystem für Interaktionen relevanten Zellen, wie vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Leukozyten einschließlich Makrophagen, werden ebenfalls von SIP beeinflusst. Nach systemischer oder lokaler Applikation von SIP, in Abhängigkeit vom betroffenen Gefäßsystem, kam es in Nagerexperimenten zu Vasokonstriktion bzw. zu Vasodilatation. Hierbei wird eine Beteiligung insbesondere der SIP_2 - oder SIP_3 -Rezeptoren vermutet.^[8,70]

Ein *In vivo*-Mausmodell für Myokardinfarkt konnte zeigen, dass HDL-assoziiertes SIP das Herz vor ischämischen bedingten Schäden schützen kann. Nach einer SIP_3 -Aktivierung (vermutlich auch SIP_1) über Phosphatidylinositol 3-Kinase und Proteinkinase B kommt es zu einem intrazellulären Calcium²⁺-Anstieg, der die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase auslöst (vgl. Abbildung 10). SIP beeinflusst somit die NO-abhängige Blutgefäßerweiterung. Es deutet Vieles darauf hin, dass die artherio- und kardioprotektive Wirkung von HDL maßgeblich auf das gebundene SIP zurückzuführen ist.^[32,69]

SIP_1 - und SIP_3 -Rezeptoren spielen vor allem bei der Ausbreitung von Tumoren eine wesentliche Rolle. Sie sind sowohl bei der Regulierung der Mobilität und Migration von Krebszelle (SIP_1 und SIP_3), der Proliferation als auch in der Regulierung der (Neo-) Angiogenese (SIP_1) involviert. Es wird vermutet, dass Krebszellen in autokriner Weise durch die Freisetzung von SIP vor Apoptose geschützt werden und das SIP ihr (Gefäß-) Wachstum fördert (vgl. Seite 12). Tatsächlich ist die Expression und Aktivität von SK1 und somit die SIP-Konzentration in mehreren Tumorarten (Prostata-, Pankreas, Leukämie) erhöht. Sie trägt zur chemotherapeutischen Resistenz bei. Daher sind therapeutische Ansatzpunkte, die das Ceramid Sphingosin SIP-Gleichgewicht in Richtung des Ceramids verschieben, ein wichtiger und vielversprechender Weg in der Arzneimittelentwicklung.^[4]

Die während einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks auftretende systemische Entzündung wird durch SK1 beeinflusst. Im Mausversuch konnte durch selektive Blockade von SK1 ein tödlicher septischer Schock vermieden werden, was auf die verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zugeführt wird.^[71,72] Der SIP_3 -Rezeptor auf dendritischen Zelle scheint eine wesentliche Rolle bei der Sterblichkeit bei Sepsis zu spielen.^[37,73]

Die Nierenfunktion während eines akuten, ischämischen Nierenversagens konnte durch Behandlung mit einem selektiven SIP_1 -Rezeptoragonisten (SEW2871 (Abbildung 21)) um 40% verbessert werden. Die Bindung an den SIP_1 -Rezeptor führte zu einer Senkung der durch das Nierenversagen verursachten Hochregulation von TNF- α und ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsions-

onsmolekül 1) im Bereich der Ischämie in der Niere, und zu einer Reduktion der zirkulierenden Lymphozyten sowie infiltrierenden Neutrophilen im äußern Nierenmark.^[74,75]

Infolge von Immunstimulation wird S1P vermehrt in Mastzellen und Thrombozyten generiert, wobei freies S1P rasch durch S1P-Lyase abgebaut wird. Die entsprechenden Enzyme, wie SKs, werden durch verschiedene Immunmediatoren (z.B. Endotoxin, Interleukin-1 (IL-1) und TNF α) stimuliert bzw. aktiviert. Während Erythrozyten im Blut die Hauptquelle für S1P sind, wird lymphoides S1P neben Mastzellen und Thrombozyten hauptsächlich von Endothelialzellen gebildet, die im Blut einer untergeordneten Rolle besitzen^[47] Wie auch in anderen Körperregionen entfaltet S1P in auto- und paracrine Weise seine Wirkung auf Immunzellen in Abhängigkeit der spezifischen Rezeptorverteilung.

In autocrine Weise beeinflusst S1P die Mastzellenmigration und Sekretion, wohingegen die Thymozyten- und Lymphozytenwanderung sowie deren Verteilung in den Lymphorganen in paracrine Weise beeinflusst/gesteuert wird.^[9,26,76]

Angepasst an den S1P-Gradienten, der im Blut hoch und im Gewebe niedrig ist, ist der Expressionssiegel von S1P₁ im Blut bzw. den Lymphflüssigkeiten entsprechend niedrig, in den Lymphknoten hingegen hoch. Dabei ist das Expressionsniveau der S1P-Rezeptoren in den verschiedenen Lymphozyten abhängig von deren Reifungsgrad bzw. Grad an immunologischer Aktivierung (vgl. Seite 22). In Lymphozyten bleibt bei Aktivierung von S1P₁, im Gegensatz zu anderen G Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Expression der Rezeptoren erhalten, was auf das effiziente Recyclingsystem zurückzuführen ist. Der Rezeptor wird nach Bindung durch S1P, phosphoryliert, internalisiert und anschließend wieder neu exprimiert.^[22] Im Falle einer Immunaktivität wird die Expression von S1P₁ jedoch stark reduziert.^[9,47,69]

Die S1P-vermittelte Kontrolle der Lymphozytenwanderung, Migration und Rezirkulation ist eine der Hauptaufgaben der S1P₁-Rezeptoren. Mäuseversuche haben gezeigt, dass der S1P₁-Rezeptor essentiell für die Immunantwort bzw. das Auswandern von Lymphozyten aus den Lymphorganen ist (vgl. Seite 21).

2.2.5.3 Fingolimod

Der Wirkstoff FTY720, auch Fingolimod genannt (Abbildung 11), ist seit März 2011 in Form des Präparats Gilenya® (Novartis) auch in Deutschland und der EU bedingt zur Behandlung von schubförmiger remittierender Multiples Sklerose (RR-MS) zugelassen. In den USA ist er seit September 2010 als Basistherapeutikum für MS zugelassen. Fingolimod ist der erste Arzneistoff, der direkt im Sphingolipid-Bereich wirkt und das erste oralverfügbare MS-Medikament. Seine Entwicklung, die zahlreichen durchgeführten bzw. laufenden klinischen Studien haben viel zur Aufklärung und zum Verständnis des Sphingolipidstoffwechsels beigetragen und verdeutlichen das Potenzial für die Entwicklung neuer Medikamente im Bereich der Sphingolipide.

Entwickelt wurde Fingolimod im Zuge von Struktur-Aktivität-Beziehungen (SAR) an Myriocin (2-Amino-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-14-oxoicos-6-ensäure), einem isolierten Metaboliten aus dem in der traditionellen chinesischen Kräuterkunde als Jungbrunnen verwendetem Pilz *Isaria sinclarii*. Myriocin als auch Fingolimod sind Sphingosinanaloga, wobei Myriocin als Inhibitor der Serin-Palmitoyltransferase (SPT) wirkt. Myriocin zeigte in frühen Studien eine immunsuppressive Wirkung bei Mäusen, die mit einer gastrointestinalen Toxizität einherging. Fingolimod ist die Weiterentwicklung von Myriocin und wurde zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin entwickelt. Um das Überleben von transplantierten Organen in Tierversuchen zu verlängern, waren jedoch in der entsprechenden klinischen Phase-II-Studie hohe Dosen oder die Kombination mit klassischen Immunsuppressiva erforderlich. Die nicht erfolgreiche Phase-II-Studien führten dazu, dass die klinische Prüfung von Fingolimod nicht mehr in der Transplantationsmedizin, sondern zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen weitergeführt wurde.^[76,77]

Fingolimod (**1**) ist ein Prodrug, das erst durch Phosphorylierung mittels SK2 (hauptsächlich in der Leber, den Nieren, dem Herz und im Gehirn exprimiert)^[40] in die eigentlich aktive Substanz Fingolimod-Phosphat (**2**) umgewandelt wird, wobei nur die *pro-S* Hydroxygruppe phosphoryliert wird und aktiv ist (Abbildung 11). Die Phosphorylierung geschieht hauptsächlich in der Leber, wobei Fingolimod auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und dort phosphoryliert werden kann. Die Wirkung von Fingolimod-Phosphat beruht auf der agonistischen Bindung an die S1P_{1,3,4,5}-Rezeptoren mit IC₅₀-Werten von 0.28 nM (S1P₁), 6.2 nM (S1P₃), 15 nM (S1P₄) und 0.77 nM (S1P₅).^[78] Am S1P₂-Rezeptor ist **2** nicht aktiv (IC₅₀ = 1100 nM).^[78] Die Bindung verursacht zudem durch persistente Aktivierung eine Internalisierung und einen Abbau des Rezeptors. Daher wirkt Fingolimod als funktionaler Antagonist. Die durch S1P₁ vermittelte Lymphopenie stellt einen neuen Therapieansatz dar, der an einem bisher nicht adressierbaren Punkt der MS-Pathologie angreift.^[24,38,76]

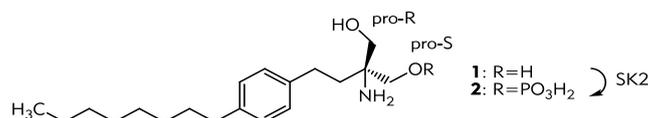


Abbildung 11: Struktur von Fingolimod (**1**) (2-Amino-2-(4-octylphenethyl)propan-1,3-diol)

2.2.5.3.1 Wirkungsweise von Fingolimod und MS-Pathologie

Multiple Sklerose zeichnet sich durch vielfache (multiple) Entzündungen der weißen Substanz im Gehirn und Rückenmark aus. Dabei greift das Immunsystem, unter Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS), die Myelinschutzschicht der Nervenfasern an und baut sie ab (Demyelinisierung). Die freiliegenden Nervenfasern werden infolge der Entzündung langsam zerstört und es kommt zur fehlerhaften Reizweiterleitung in den Nerven.^[79,80]

2.2.5.3.1 Wirkungsweise von Fingolimod und MS-Pathologie

Durch längere, intensivere Antigenpräsentation (symbolisiert durch die Keile in Abbildung 12) werden im Lymphknoten aus naiven T-Zellen (T_n) zentrale und Effektor-Gedächtniszellen (T_{CM} und T_{EM}) gebildet, die wie T_n zwischen Blut und den sekundären Lymphorganen zirkulieren. T_{CM} sind maßgeblich an den Angriffen auf das ZNS beteiligt. Durch eine permanente Stimulation des CCR7-Rezeptors werden sie im Lymphknoten gehalten und können ihn erst durch ein S1P-vermitteltes Austrittssignal des S1P₁-Rezeptors verlassen (roter Pfeil in Abbildung 12). Dabei übertrifft das durch Bindung von S1P verursachte Signal das Verweilsignal des CCR7-Rezeptors und ist essentiell für das Verlassen des Lymphknotens von T_{CM} und T_n . T_{EM} exprimieren keinen CCR7-Rezeptor und werden daher nicht vom S1P₁-vermitteltem Austrittssignal beeinflusst. Sie können den Lymphknoten verlassen und sorgen für die lokale Abwehr von Pathogenen, da sie in verschiedene Gewebearten eindringen können. Im ZNS von MS Patienten sind ca. 90% der eingewanderten T-Zellen T_{CM} , die dort zu Effektor-Zellen (T-Helfer- und T-Killerzellen (T_H und T_K)) reifen und weiteren Schaden anrichten.^[66,76,81-83]

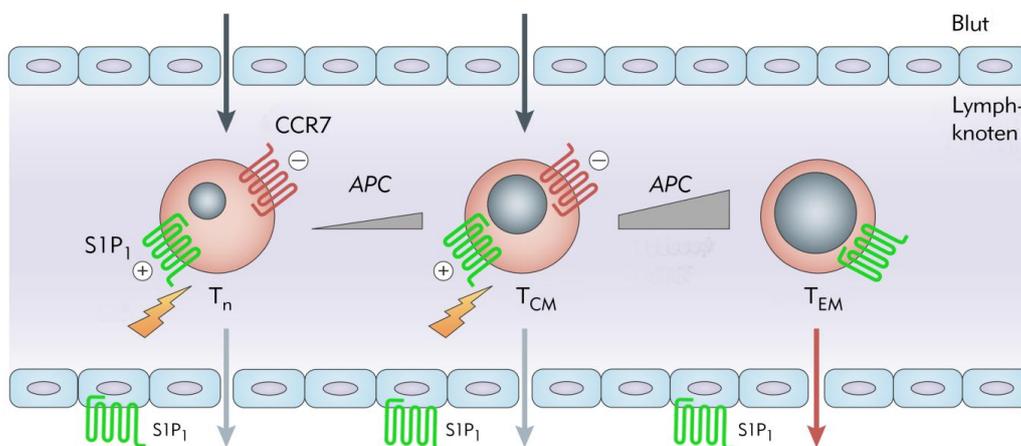


Abbildung 12: S1P₁-Abhängigkeit der Auswanderung von naiven T-Zellen (T_n), zentrale und Effektor-Gedächtniszellen (T_{CM} , T_{EM}), APC = Antigenpräsentierenden Zellen (modifiziert nach ^[47,76]^[83])

Die Bindung von Fingolimod-Phosphat an den S1P₁-Rezeptor auf T_n und T_{CM} führt zu Internalisierung und zum Abbau des Rezeptors, sowie zu einer Verringerung der Neuexpression (vgl. Seite 29). Als Folge davon kommt das S1P₁ vermittelte Austrittssignal nicht zu Stande woraufhin die T_n und T_{CM} im Lymphknoten verbleiben. Zudem wird durch Wechselwirkung von Fingolimod-Phosphat mit S1P₁-Rezeptoren auf dem Endothel der Lymphknoten und der BHS die Permeabilität dieser Membranen reduziert. Dies begünstigt die Lymphopenie und vermindert das Eindringen ins ZNS.^[9,27]

Fingolimod bzw. Fingolimod-Phosphat wirkt auch auf andere in der MS-Pathologie beteiligte Teile des Immunsystems. Auf unreifen dendritischen Zellen wird S1P₄ überexprimiert, wohingegen die Expressierung von S1P₁ und S1P₅ mit der Reifung zunimmt. Es ist folglich verständlich, dass Fingolimod auf deren Reifung Einfluss nehmen kann und damit den Verlauf der MS positiv beeinflusst. Unreife dendritische Zellen erhalten die Selbsttoleranz des Immunsystems, in dem sie die Entstehung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und anti-inflammatorischen T2-Helferzellen (T_H2) bewirken (Abbildung 13). T_{reg} -Zellen sind dabei essentielle für den Erhalt der Immunotoleranz und beeinflussen wiederum die T-Zellenaktivierung und Proliferation. Dendritische Zellen können zu antigenpräsentierenden Zellen (APC) reifen, in dem sie in der Antigenprozessierung (z.B. Myelin im Falle von MS), Antigene auf Haupthistokompatibilitätskomplexen II (MHC class II = *major histocompatibility complex*) ausbilden.^[76,79,83]

2. Theoretischer Hintergrund - 2.2 Sphingolipide

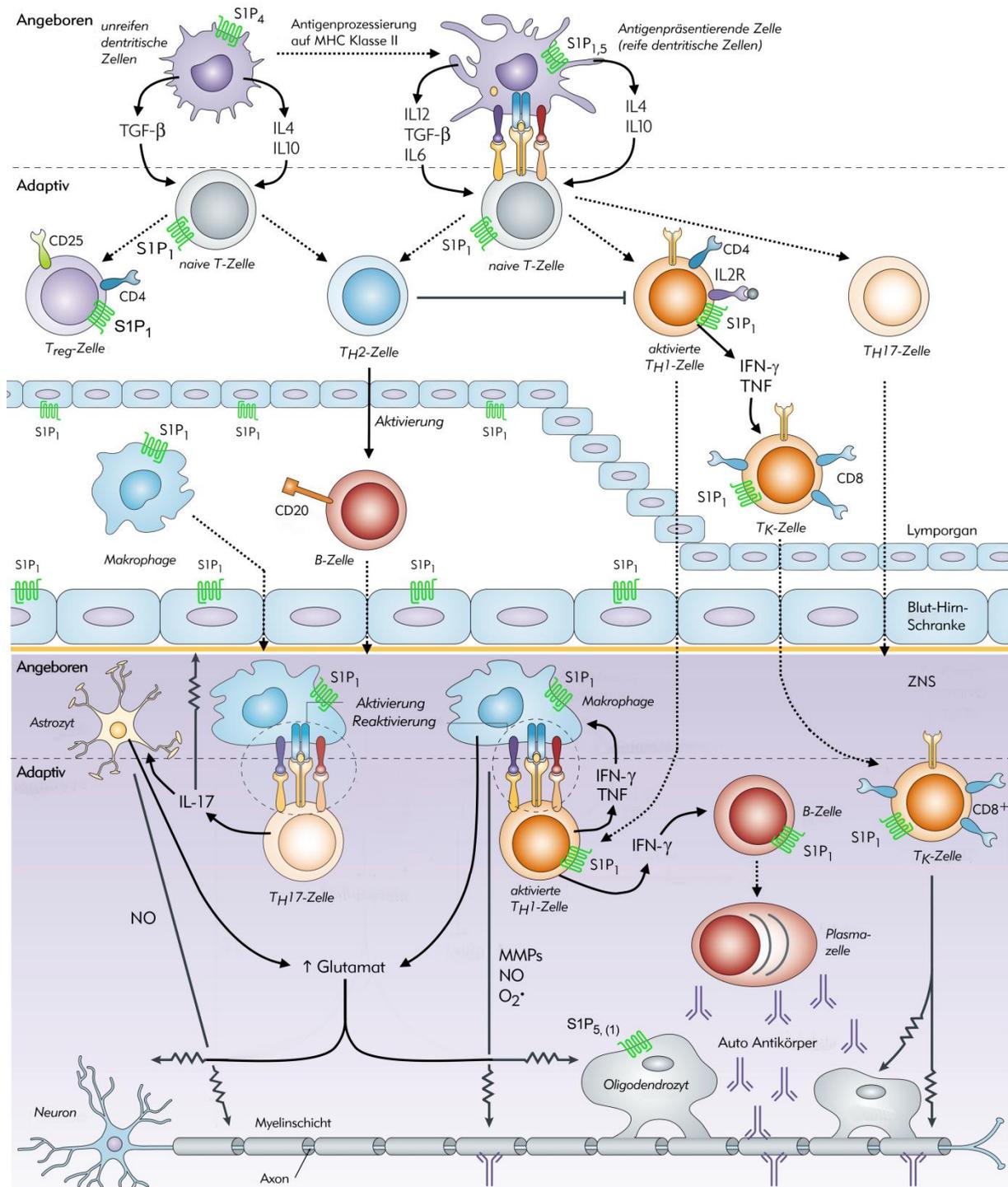


Abbildung 13: Schematische Darstellung der MS-Pathologie (modifiziert nach [76,82])[83]

Bei MS-Patienten sind APC außergewöhnlich aktiv und setzen vermehrt pro-inflammatorische Zytokine (Interleukin (IL): IL4, IL6, IL10, IL12 und den Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β)) frei. Dies führt zu einer Aktivierung von pro-inflammatorischen T1-Helferzellen (T_H1 , auch autoreaktive CD4+ Zellen genannt) und T17-Helferzellen (T_H17). Unter Fingolimod-Behandlung zeigt sich eine beeinträchtigte Mobilität von dendritischen Zellen bzw. APCs und eine verringerte Aktivierung von T- und B-Zellen durch diese.^[76,81,82]

Aktivierten T_H1 Zellen setzen Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor (TNF) frei, wodurch sie wiederum T-Killerzellen (T_K , auch autoreaktive CD8+ Zellen genannt) aktivieren. Wie auch aktivierte T_H1 und T_H17 können T_K s durch Wechselwirkung mit speziellen Oberflächenproteinen

die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Zudem wird Matrix Metalloproteinasen (MMPS) bei der Überwindung der BHS eine entscheidende Rolle zugeschrieben. B-Zellen, welche durch T_H2 aktiviert werden, wandern ebenfalls über die BHS ins ZNS ein.^[76,82,83]

Durch die Anwesenheit der autoreaktiven Immuneffektoren (aktivierte T_H1 , T_H17 , T_K und immunaktivierte B-Zellen) und der sehr aktiven Astrozyten und Makrophagen werden vermehrt reaktive Stoffen (z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen (O_2)) produziert. Außerdem steigert das die Exzitotoxizität (z.B. Glutamat aus Astrozyten und Makrophagen^[84]), Autoantikörperproduktion und die direkte Zytotoxizität. Diese Faktoren bedingen die neurodegenerativen Prozesse, die Demyelinisierung, die axonale und neuronale Schädigung im ZNS von MS-Patienten.^[66,76]

T_H1 werden im ZNS durch Makrophagen reaktiviert, vermehren sich und schütten pro-inflammatorisches TNF und IFN- γ aus, die wiederum B-Zellen aktivieren. Aktivierte B-Zellen reifen zu Plasmazellen und schütten Antikörper aus, die unter anderem den Abbau von Oligodendrozyten (ODG) und der Myelinschicht bewirken. TNF führt dabei direkt zum Tod der ODGs. Zusammen mit aktivierten Makrophagen greifen T_K , die in größerer Anzahl verglichen zu aktivierten T_H1 im ZNS von MS-Patienten vorhanden sind, direkt die ODGs und die Myelinschicht an. Durch das von Astrozyten ausgeschüttete NO werden freiliegende Axone zerstört. T_H17 können Makrophagen unter Ausschüttung von IL-17, IFN- γ und TNF aktivieren. Astrozyten werden außerdem durch die Freisetzung von IL-17 aktiviert, wobei das IL-17 für die zunehmende Permeabilität der BHS verantwortlich ist.^[66,76,79,83]

Diese degenerativen Prozesse werden durch die neuroprotektive Wirkung von Fingolimod positiv beeinflusst. Es kommt zu einer verminderten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen und Astrozyten, was wiederum die T-Zell-Aktivierung vermindert. Zudem produzieren Makrophagen vermehrt anti-inflammatorische Zytokine. Die Wechselwirkung mit $S1P_5$ (in geringem Maße auch $S1P_1$) auf ODGs ist mitunter der Grund für eine erhöhte Remyelinierung der Axone.^[9,66,76]

Klinische Pharmakologie und unerwünschte Wirkungen

Der therapeutische Nutzen von Fingolimod zur Behandlung von MS wurde in mehreren klinischen Phase-II, III und IV-Studien bestätigt. In der Vergleichsstudie konnte gezeigt werden, dass das orale verabreichte Fingolimod besser wirksam ist als der intramuskulär verabreichte, bisherige Standard IFN- $\beta 1a$. Dies gilt vor allem im Hinblick auf die Verringerung der Schubrate, die deutliche Reduktion der Läsionsaktivität im Gehirn und den geringeren Verlust an Gehirnvolumen in der Magnetresonanztomographie (MRT). Der Fortschritt der klinischen Behinderung wurde durch Fingolimod über zwei Jahre im Vergleich zu Placebo statistisch signifikant reduziert. Darüber hinaus war die Therapietreue durch die einfachere orale Verabreichung höher als bei subkutaner Therapie.^[76,85]

2.2.5.3.2 Nebenwirkungen und off-target-Effekte von Fingolimod

Zu den häufigsten Nebenwirkungen bei Fingolimod-Behandlung zählten Kopfschmerzen, Influenza, Diarrhö, Rückenschmerzen, Anstieg der Leberenzyme, Husten und Bradykardie. Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse traten in allen Behandlungsgruppen ähnlich oft auf. Das günstigste Nutzen-Risiko-Profil zeigte sich bei einer Dosierung von 0.5 mg Fingolimod in der es auch zugelassen wurde.^[76,85]

Einige, aber nicht alle Nebenwirkungen von Fingolimod können auf die Wechselwirkung mit den anderen $S1P$ -Rezeptoren bzw. die systemische Immunsuppression zurückgeführt werden. Eine

kurzfristige S1P₁-abhängige Aktivierung des G Protein-kontrollierten Kaliumkanals IK_{ACh} in Vorhofmyozyten könnte für die beobachtete, vorübergehende und in der Regel asymptomatische Reduktion der Herzfrequenz (Bradykardie) und die Verzögerung der atrioventrikulären Überleitung zu Beginn der Behandlung, vor allem nach der ersten Dosis, verantwortlich sein. Die leichte Erhöhung des Blutdrucks (durchschnittlich 1 bis 2 mmHg) und das Auftreten eines Makulaödems (bei weniger als 1 Prozent der Patienten) könnten auf eine Reduktion des S1P₁-Signalling in Endothelzellen zurückgeführt werden. Dies kann zur erhöhten Aktivierung der S1P₂- und/oder S1P₃-Signalkaskade durch endogenes Plasma-S1P, zu einer reduzierten endothelialen Barrierefunktion und verminderten Aktivierung der gefäßerweiternden, blutdruckregulierenden endothelialen NO-Synthase (eNOS) führen. Ähnliche Effekte könnten bei allen funktionellen Antagonisten des S1P₁-Rezeptors auftreten.^[76,86,87]

Der beobachtete Anstieg der Leberenzyme kann bisher nicht erklärt werden, auch Tierversuche mit deutlich höheren Fingolimod-Dosen deuten nicht auf eine direkte Wechselwirkung mit Hepatozyten, Gefäß- oder Gallenwegsstrukturen hin. Im Gegenteil, bei Nagern verbesserte sich die Mikrozirkulation sowie die biochemischen und histologischen Erscheinungen bei hepatischer Ischämie-Reperfusion (vgl. Seite 29).^[76]

Jüngst wurde ein Fall von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML), einer seltenen, aber schweren viralen Gehirninfection durch das John-Cunningham(JC)-Virus, bekannt. Die schwierige Datenlage und der Einfluss von vorheriger Therapie mit anderen Immunsuppressiva lassen einen Zusammenhang mit der Fingolimod bisher ungeklärt.^[86]

2.2.6 Inhibitoren des Sphingolipidstoffwechsels

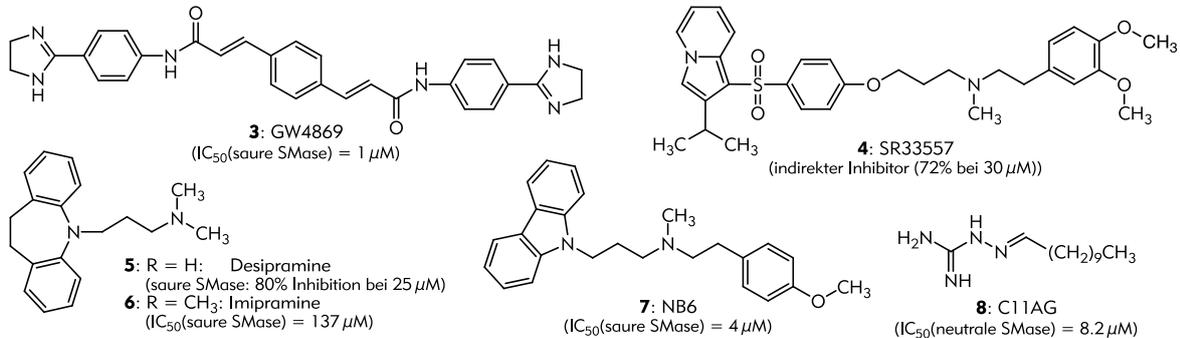
Da Sphingolipide durch ihr ubiquitäres Vorkommen im Körper an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind, gibt es viele verschiedene Ansatzpunkte, die zur Behandlung oder Linderung von Erkrankungen beitragen könnten.

2.2.6.1 Enzyminhibitoren

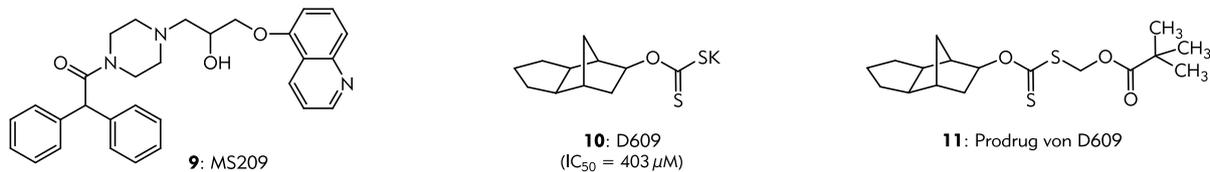
Fast alle Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels werden als potentielle Angriffspunkte zur Behandlung von Krankheiten (*drug targets*) beforscht, wobei viele Inhibitoren Sphingosinderivate oder Naturstoffe sind. Neben der Entwicklung potenzieller Arzneistoffe sind spezifische Inhibitoren für die weitere Erforschung des Sphingolipidstoffwechsel unabdingbar.^[24,54]

Inhibitoren für die SMasen (**3-8**), SMS (**9-11**), CDasen (**12-18**) sowie CerS (**19-20**) greifen alle in den Ceramid-Haushalt ein und sind somit möglicherweise in der Krebstherapie einsetzbar. Einige Vertreter sind in Abbildung 14 dargestellt. Bei den CerS-Inhibitoren existieren viele Fumonisinderivative, die sich in der stereochemischen Orientierung und den Substituenten unterscheiden (vgl. **20**).^[33,54]

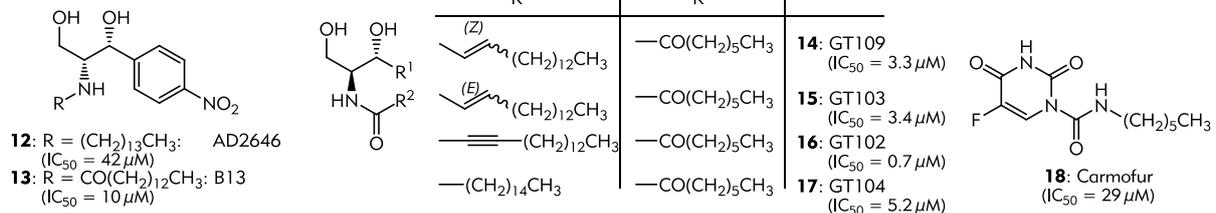
SMase Inhibitoren:



SMS Inhibitoren:



CDase Inhibitoren:



CerS Inhibitoren:

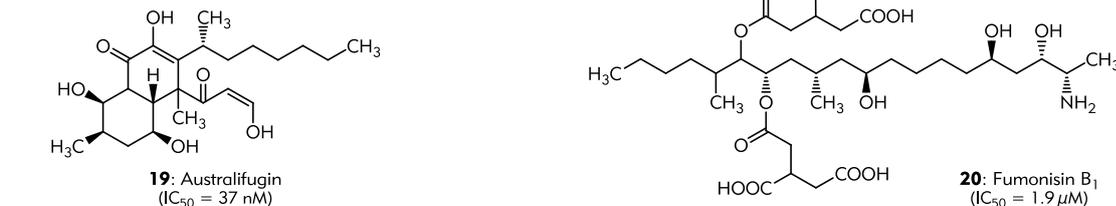


Abbildung 14: Inhibitoren für SMase **3-8**^[54,55,88-91], SMS **9-11**^[92], CDase **12-18**^[93-95] und CerS **19-20**^[96,97].

S1P-Lyase Inhibitoren gelten als neue *drug target* zur Immunsuppression, da sie den S1P-Gradienten durch eine Akkumulation von S1P zerstören, was wie bei Fingolimod, Lymphopenie zur Folge hat. Zuerst wurde dieses Verhalten beim dem Lebensmittelfarbstoff THI (**21**) festgestellt (Abbildung 15). Die Wirksamkeit des THI-Derivat LX2931 (**22**) wurde bereits einer klinische Phase-II-Studien für rheumatoide Arthritis bestätigt, wobei die *In vivo*-Inhibition der S1P-Lyase nicht nachgewiesen werden konnte.^[24,49]

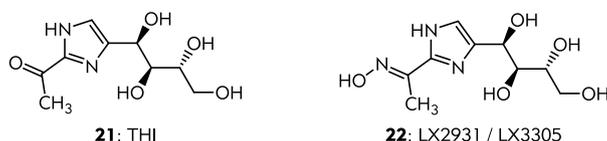


Abbildung 15: S1P-Lyase Inhibitoren THI und LX2931^[98]

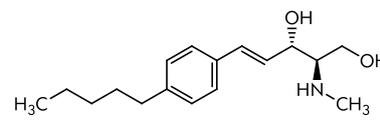
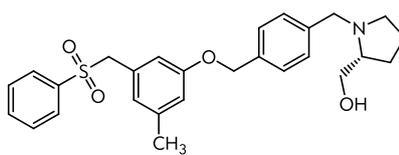
Da sich in Mausmodellen gezeigt hat, dass sich das Tumorwachstum und die Metastasierung durch S1P-Antikörper reduzieren lässt, wird zur Zeit der humanisierte, monoklonale Antikörper Sonepcizumab (iSONEP) in einer Phase-II-Studien untersucht.^[24] Durch das „Abfangen“ des S1P wird die S1P unterstützte Angiogenese stark reduziert.^[4,49]

Ein ähnliches Wirkprinzip weisen SK-Inhibitoren auf. Hierbei zeigte sich jedoch, dass viele Substanzen, z.B. PF-543 (**24**) die beobachteten *In vitro*-Effekte nicht mehr zeigten. Dies könnte zum Teil darauf zurückgeführt werden, dass mit dem Sinken der S1P-Konzentration nicht gleichzeitig die Menge an pro-apoptotischem Ceramid steigt.^[24]

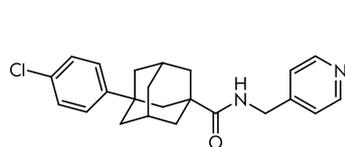
ABC294640 (**26**) ein selektiver SK2-Inhibitor, befindet sich zurzeit in einer klinischen Phase-I-Studien bei Bauspeicheldrüsenkrebs. Er weist neben einer oralen Verfügbarkeit und ist im Gegensatz zu PF-543 auch *in vivo* wirksam.^[4,24]

In Abbildung 16 sind weitere selektive und unselektive SK-Inhibitoren gezeigt, die trotz der fehlenden *In vivo*-Effekte als Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung dienen bzw. in *In vitro*-Test eingesetzt werden.^[24]

SK1 selektive:



SK2 selektive:



unselektive:

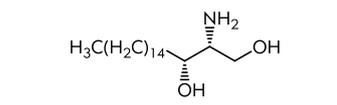
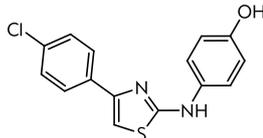


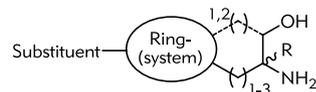
Abbildung 16: SK-Inhibitoren^[24,99,100]

2.2.6.2 S1P-Rezeptorliganden

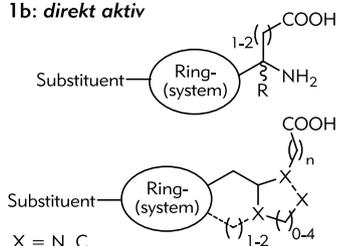
Die Anzahl an S1P-Rezeptorliganden in der Literatur ist stetig wachsend und der Strukturvielfalt sind dabei kaum Grenzen gesetzt. Dennoch lassen sie sich grob in zwei bzw. drei Gruppen einteilen (Abbildung 17).^[101]

Gruppe 1: S1P-Liganden mit polarer Kopfgruppe

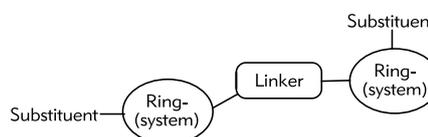
1a: phosphoryliert aktiv

R = -H, -CH₃, -CH₂OH

1b: direkt aktiv



X = N, C

Gruppe 2: Neutrale S1P-Liganden

Substituent = (O/S) Alkyl, Aryl, Heteroaryl

Abbildung 17: Einteilung der S1P Rezeptorliganden^[101]

Gruppe 1a, zu der auch Fingolimod (**1**) gehört, sind Sphingosin-Mimetika vom Aminoalkohol-typ. Sie sind Prodrugs, die *in vitro* inaktiv ist und erst durch *in vivo*-Phosphorylierung zu potenten Liganden werden. Diese aus medizinisch, chemischer Sicht anspruchsvollen Moleküle müssen zweifach affin sein. Sie müssen zunächst durch eine der zwei SKs phosphoryliert werden und das entstehende Phosphat muss dann an einen S1P-Rezeptor binden. Zudem darf das Phosphat nicht zu instabil sein bzw. zu schnell von den verschiedenen Phosphatasen abgebaut werden.^[101]

Die polare Aminoethanol-Kopfgruppe kann neben einer Methanolgruppe auch eine Methylgruppe tragen, wodurch sich die entsprechenden Stereoisomere ergeben. Die Kopfgruppe kann über verschiedenartige Linker (z.B. Alkyl, Alkyloxi/oxa) an einen Aromaten oder ein aromatisches System gebunden sein, dass seinerseits meist substituiert ist. Der substituierte Ring bzw. das Ringsystem imitiert dabei den lipophilen C15-Alkylrest des Sphingosins. Außer Phenol- oder Thiol-Derivaten können auch bi- oder tri-Arylsysteme bzw. Heteroaromaten (z.B. 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol) oder die entsprechenden annellierten bzw. tetrahydro System mit der Kopfgruppe verknüpft sein.

Alle in Abbildung 18 gezeigten Prodrugs bzw. ihre Phosphate zeigen eine mehr oder weniger große Präferenz für den S1P₁-Rezeptor, außer dem Benzothiophen **37**^[102]. Es hat sich einerseits gezeigt, dass die Phosphorylierung unter anderem von der Aminoalkoholfunktion und andererseits von der Beschaffenheit des Linkers zwischen ihr und dem zentralen Phenylring abhängt. Die S1P₁-Selektivität hingegeben kann durch Wahl des langen, lipophilen Restes und durch Substituenten am Ring beeinflusst werden. Dabei scheint eine zusätzliche Substitution an Position 2 des zentralen Rings die Selektivität für S1P₁ signifikant zu erhöhen.^[101]

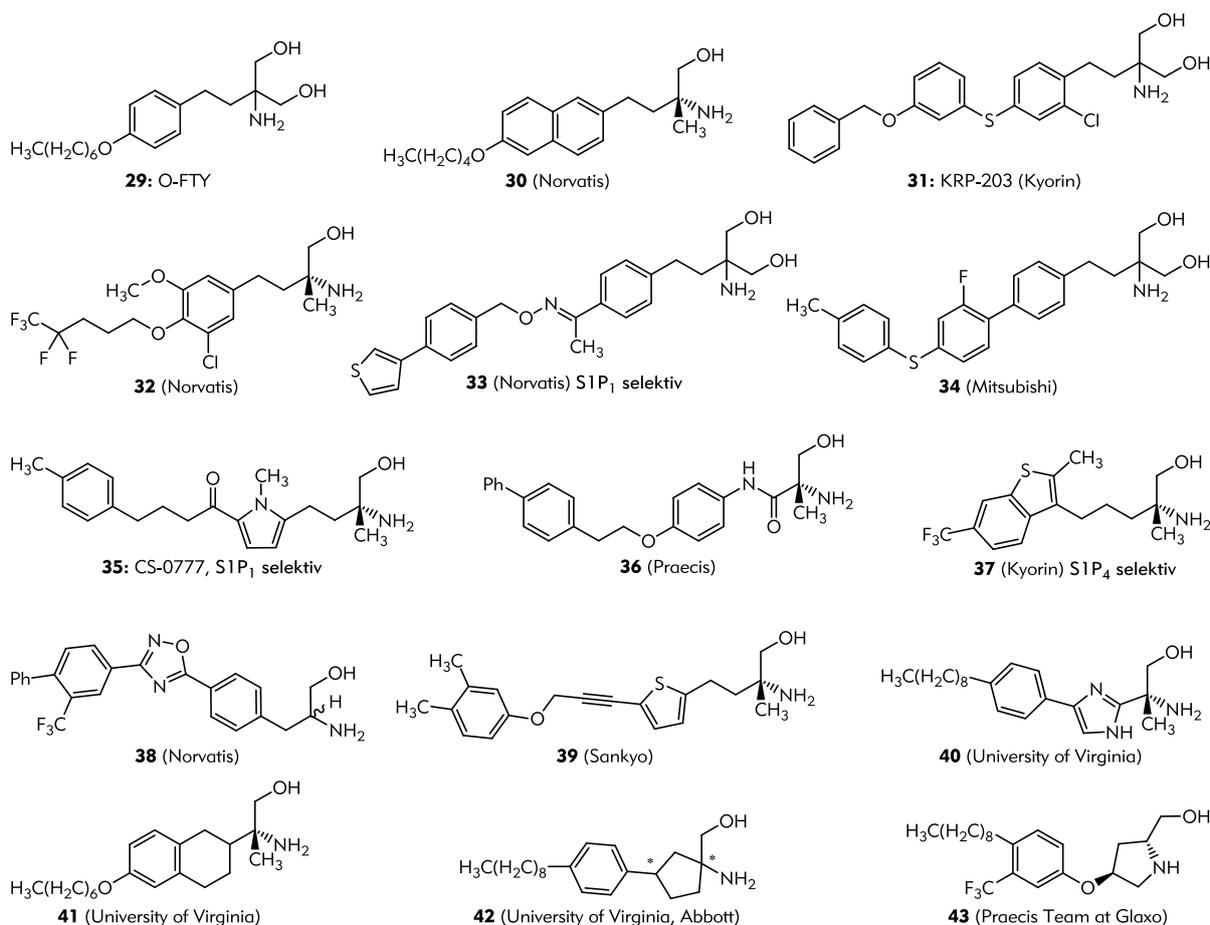


Abbildung 18: S1P Liganden der Gruppe 1a^[102-117]

Das Phosphat des oxy-Analogons **29**^[103,104] zeigt eine vergleichbare Aktivität und Selektivität wie Fingolimod-Phosphat (**2**)^{[78]. [104]} Durch Vergrößerung des Phenylring zu Naphthyl und die Methylaminoethanol-Kopfgruppe, wie in **30**^[105], steigt der IC₅₀-Wert (für das Phosphat) für den S1P₄- und S1P₅-Rezeptor (0.4 nM und 0.1 nM vs. 15 nM und 0.77 nM für **2**), wohingegen die Affinitäten für die anderen Subrezeptoren gleich bleiben. Fluorierung der Alkylkette, wie z.B. in **32**^[107], bewirkt eine Verbesserung der Selektivität von S1P₁ zu S1P₃ wobei eine Aktivität am S1P₃-Rezeptor aufgrund vermuteter Nebenwirkungen nicht erwünscht ist. Die Phosphate von Novartis' Verbindung **33**^[108] und CS-0777 (**35**)^[110], sind beides S1P₁ selektive Agonisten, obwohl sie sehr unterschiedliche Strukturen aufweisen. CS-0777-Phosphat zeigte eine 320-fache höhere Affinität zu S1P₁ (EC₅₀ (Phosphat) = 1.1 nM)^[24] gegenüber S1P₃, bei schwacher Aktivität an S1P₅.^[110] Die Phosphate der Arylthio- oder auch Aryloxy-Erweiterungen bzw. Ringverknüpfungen in **31** und **34**^[109] weisen ebenfalls fast keine Aktivität an S1P₃, bei schwacher Aktivität an S1P₄. Für KRP-203 (**31**)^[106], der sich zurzeit in einer klinischen Studie zu haematologischen, bösartigen Tumoren befindet, konnte eine verminderte, S1P₃-vermittelte, Senkung der Herzfrequenz nachgewiesen werden.^[24,101] Die Phosphate der amidverknüpfte Derivate wie **36**^[111] sind im Allgemeinen an allen Rezeptorsubtypen weniger aktiv. Sie weisen dennoch eine hohe Selektivität von S1P₁ gegenüber S1P₃ auf (1:200 für **36**). Das Aryl-Linker-Aryl-Motiv, das sich in vielen S1P-Liganden findet, zeigt in **38**^[112], mit einem Oxadiazol-Linker, eine ca. 20-fache Selektivität von S1P₁ zu S1P₃ (für das Phosphat), obwohl es sich strukturell sehr von den anderen Aryl-lipophiler Rest-Kombinationen unterscheidet. Wird statt eines Phenylrings als zentraler Baustein ein Heterozyklus verwendet, zeigt sich eine andere Selektivität. Das Phosphat des Benzothiophen-Derivats **37**^[102] ist eine S1P₄-Rezeptoragonist. Eine andere Heterozyklenkombination liegt in

2.2.6.2 S1P-Rezeptorliganden

40^[114] vor. Hier wurde der Dimethylenspacer durch Imidazol ersetzt, was zu einem vollen S1P₁-Rezeptoragonist führt. Dahingegen führt die Verschmelzung von Imidazol und Phenyl zum Benzimidazol (nicht gezeigt in Abbildung 18) zu einem S1P₄-Rezeptoragonisten (vgl. **37**).^[118] Wird der Spacer zwischen der Aminoalkohol-Kopfgruppe und dem Phenylring über einen azyklischen Ring mit diesem verknüpft (**41**^[115]), weisen die Phosphate dieser Substanzen eine höher Affinität zum S1P₁-Rezeptor als Fingolimod-Phosphat (**2**) auf. Bei **42**^[116], einem weiteren Cycloalkylderivat, zeigt sich eine interessante Aktivitätsverteilung bezogen auf die vier Stereoisomere. Sind der Arylrest und die Aminogruppe im Cyclopentylring 1,3-*trans* angeordnet, so weisen die entsprechenden Phosphate keine Aktivität am S1P₁-Rezeptor auf. Dabei verhalten sich die Phosphate aller vier Stereoisomere als Antagonist am S1P₃-Rezeptor. Die 1,3-*cis*-Anordnung hingegen führt zu S1P₁ aktiven Substanzen. Wird das Amin der Kopfgruppe rigidisiert und zum sekundären Amin wie in **43**^[117], so bleibt die S1P₁ Aktivität des Phosphats mit vergleichbarem Selektivitätsprofil erhalten.^[101]

Da die Aminoethanol-Liganden immer von einer der beiden SKs als Substrat akzeptiert werden müssen, um an S1P-Rezeptoren aktiv sein zu können, wurden viele Liganden direkt als Phosphate oder als chemisch und enzymtisch stabilere Phosphonate entwickelt. Interessanterweise zeigen die in Abbildung 19 dargestellten Verbindungen keine agonistische, sondern direkt antagonistische Aktivität. Dabei zeigen die *meta*-verknüpften Phenylalkylderivate als Phosphate, **44** (VPC-23019), noch eine S1P₃-Aktivität ($pK_i = 5.9$, für S1P₁ $pK_i = 7.9$), die beim Übergang zum Phosphonat, **45** (W146) und **46** (VPC-44116), verschwindet.^[24,64,101]

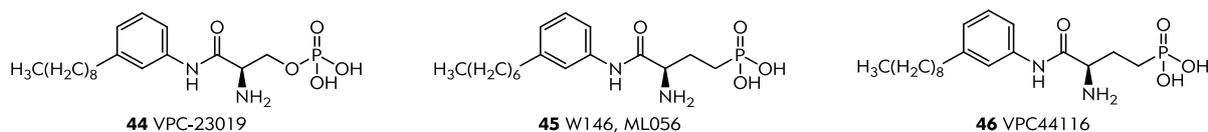


Abbildung 19: Phosphat und Phosphonat Liganden^[24,64,101]

Die Liganden der Gruppe 1b, hauptsächlich vom Aminosäure-Typ, wurden entwickelt, um die Probleme bzw. die Abhängigkeit der Phosphorylierung durch die SKs zu überwinden. Durch die direkten Aminosäurederivate konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Hydroxygruppe gegen eine Carbonsäure durchaus möglich ist und zu equipotenten Verbindungen führt.^[101] Weitaus interessanter sind jedoch die Struktur motive, die nicht als Hydroxyderivat bekannt sind (Abbildung 20).

Verbindung **47**^[119] besitzt eine Amincarbonsäure-Kopfgruppe, bei der das Amin in einen Ring eingebettet wurde. Diese und andere Pyrrolidinstrukturen zeigen gute Aktivitäten am S1P₁-Rezeptor. So wurde für **47** ein EC₅₀-Wert für die S1P₁-Rezeptor Internalisierung von 4.5 nM bestimmt. Ein weiterer Vorteil der Pyrrolidin-4/5-essigsäuren sind ihre guten pharmakokinetischen Eigenschaften.^[120,121] Auch andere zyklische (Amin-)Strukturen weisen S1P₁-Rezeptoraktivität auf. Neben Pyrrolidin, Piperidin und Azetidin scheinen die Azetidin-3-carbonsäure bevorzugte Strukturen zu sein. Aminocycloalkane, die zwei Carbonsäuren tragen, wie in **48**^[122], werden als sehr potente S1P₁- und S1P₂-Agonisten, mit einer hohen Selektivität gegenüber S1P₃ beschrieben (EC₅₀(S1P₁) = 6 nM, EC₅₀(S1P₂) = 4 nM, EC₅₀(S1P₃) > 1000 nM)^[101]. Bei **49**^[123] hingegen scheint die Natur des lipophilen Restes, 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol, dafür verantwortlich zu sein, dass keine S1P₂-Aktivität mehr vorliegt. Auch Substanzen bei denen das Amin direkt am zentralen Phenylring sitzt besitzen noch eine S1P-Rezeptoraktivität (**50**^[124]). Die Piperidincarbonsäure **51**^[125] gehört auch zur Klasse der zyklischen Amincarbonsäure und besitzt eine hohe Rezeptorselektivität von 1:1000 bezogen auf S1P₁ und S1P₃.^[101]

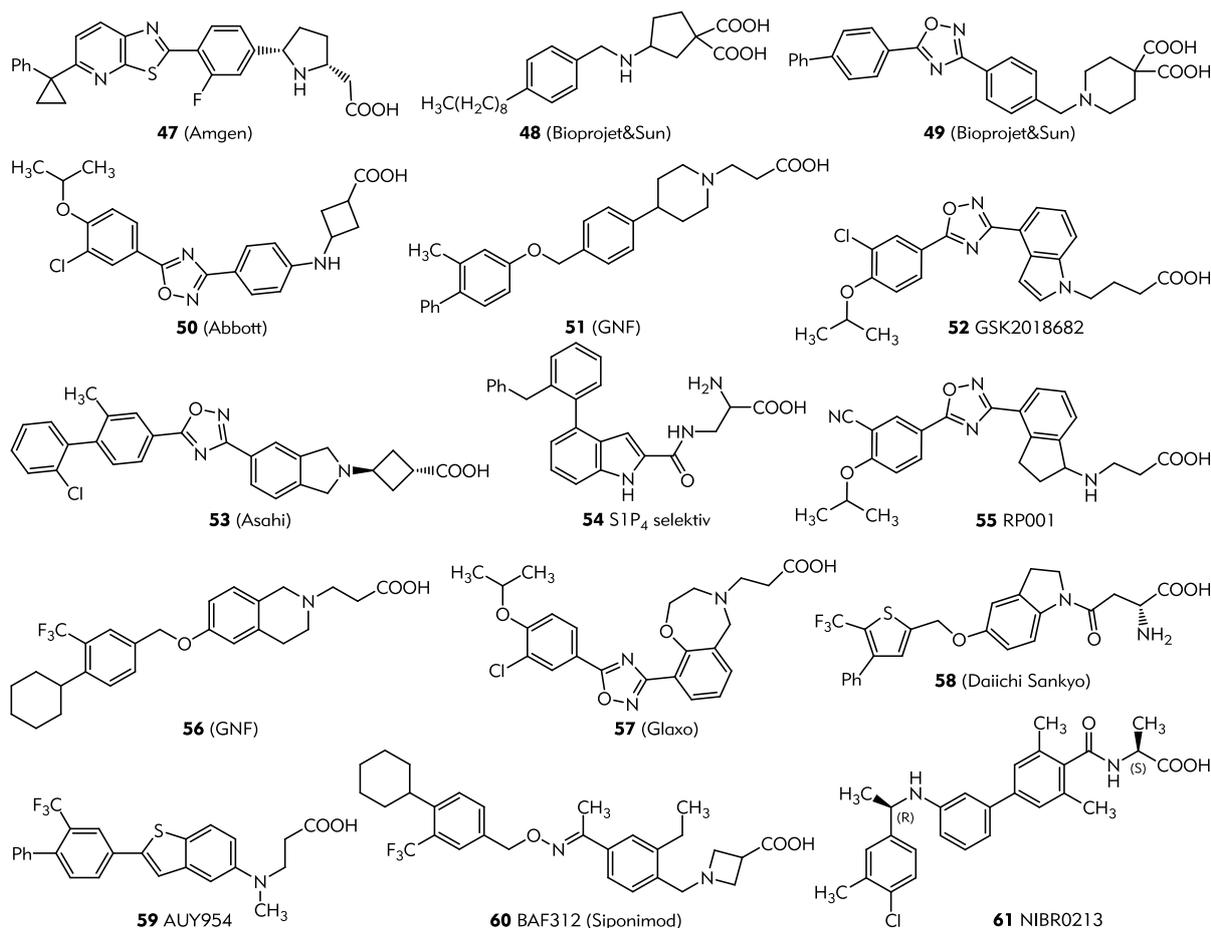


Abbildung 20: Gruppe 1b: S1P-Liganden mit Amin(o)säure-Strukturmotiv^{[119,122-125],[24],[126-133],[24]}

Die Liganden der Gruppe 1b zeigen, dass eine Vielzahl an Strukturvariationen toleriert wird und die Substanzen trotzdem potente S1P₁-Rezeptoragonisten sind. Dabei kann der Linker zwischen Amin und Carbonsäure, die Position desamins als auch die Beschaffenheit des Linkers und des zweiten Substituenten am zentralen Phenylring diskret verändert werden. Es gibt zahlreiche Beispiele für Isoindoline (**53**)^[126], Indoline, Tetrahydroisochinoline (**56**)^[129], Benzazepane und Benzoxazepane (**57**)^[130] die alle samt hoch potente S1P-Liganden sind (z.B. EC₅₀(S1P₁) für **56** = 0.2 nM). Die Strukturvielfalt ist bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass all diese Verbindungen nicht nur eine andere dreidimensionale Struktur und Anordnung des/der Pharmakophore besitzen, sondern auch verschiedene physikochemische Eigenschaften haben.^[101]

Das Indolderivate **54**, welches über ein Amid mit der Aminocarbonsäure verknüpft ist, ist nicht an S1P₁ aktiv, sondern es ist ein reiner S1P₄-Agonist mit einem EC₅₀-Wert von 10 nM.^[127] GSK2018682 (**52**) der schon zwei Phase-I-Studien zu RR-MS absolviert hat, zeigt, dass ein basischer Stickstoff nicht für S1P₁-Rezeptoraktivität benötigt wird.^[24] Ein weiterer S1P₁-Agonist mit der bevorzugten β-Alaninstruktur und dem 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Motiv ist RP001 (**55**)^[128]. In Substanz **58**^[131] findet sich ein weiteres, bevorzugtes Strukturmotiv. Das 4-Phenyl-5-(trifluoromethyl)thiophen-2-yl Element ist seit der frühen Entdeckung des selektiven Agonisten SEW2871 (**62**) (Abbildung 21) in einem high-throughput screening bekannt und in vielen Strukturen vertreten. Verbindung **58** ist ein nanomolar aktiver S1P₁-Agonist mit diesem Strukturelement. Das eine L-Alanin-Kopfgruppe tragende Biphenylderivat **61** (NIBR0213) ist ein nanomolarer Antagonist an S1P₁ (IC₅₀ = 2 nM), der bereits im Tierversuch zu MS getestet wurde.^[24] Ein prominenter Vertreter aus der Heterocyclenreihe der Benzimidazole, Benzofurane, Benzo-

2.2.6.2 S1P-Rezeptorliganden

thiophene, Benzoxazole, Benzisoxazole, Isoindoline bzw. Flavone als zentraler Aromat, ist AUY954 (**59**,^[132] selektiver S1P₁-Agonist: IC₅₀ (S1P₁) = 1.2 nM, IC₅₀ (S1P₂) > 10000 nM, IC₅₀ (S1P₃) = 1210 nM, IC₅₀ (S1P₄) > 1000 nM und IC₅₀ (S1P₅) = 340 nM)^[101]. BAF312 (**60**)^[133] hat bereits mehrere klinischen Studien, darunter auch eine Phase-III-Studie zu sekundärer, progressiver MS, absolviert.^[24] Er ist ein S1P₁- und S1P₅-Agonist mit einem EC₅₀-Wert von 0.4 nM für S1P₁.^[133]^[101]

Die Gruppe mit der größten strukturellen Vielfalt an S1P-Liganden ist die Gruppe 2. Sie bestehen meist aus zwei aromatischen Ringen die über unterschiedlichste Linker mit einander verknüpft sind. Am Anfang der Gruppe der neutralen S1P-Liganden steht SEW2871 (**62**) der keine Kopfgruppe besitzt und bei dem die beiden Aromaten über ein 1,2,4-Oxadiazol verbunden sind (Abbildung 21).^[101]

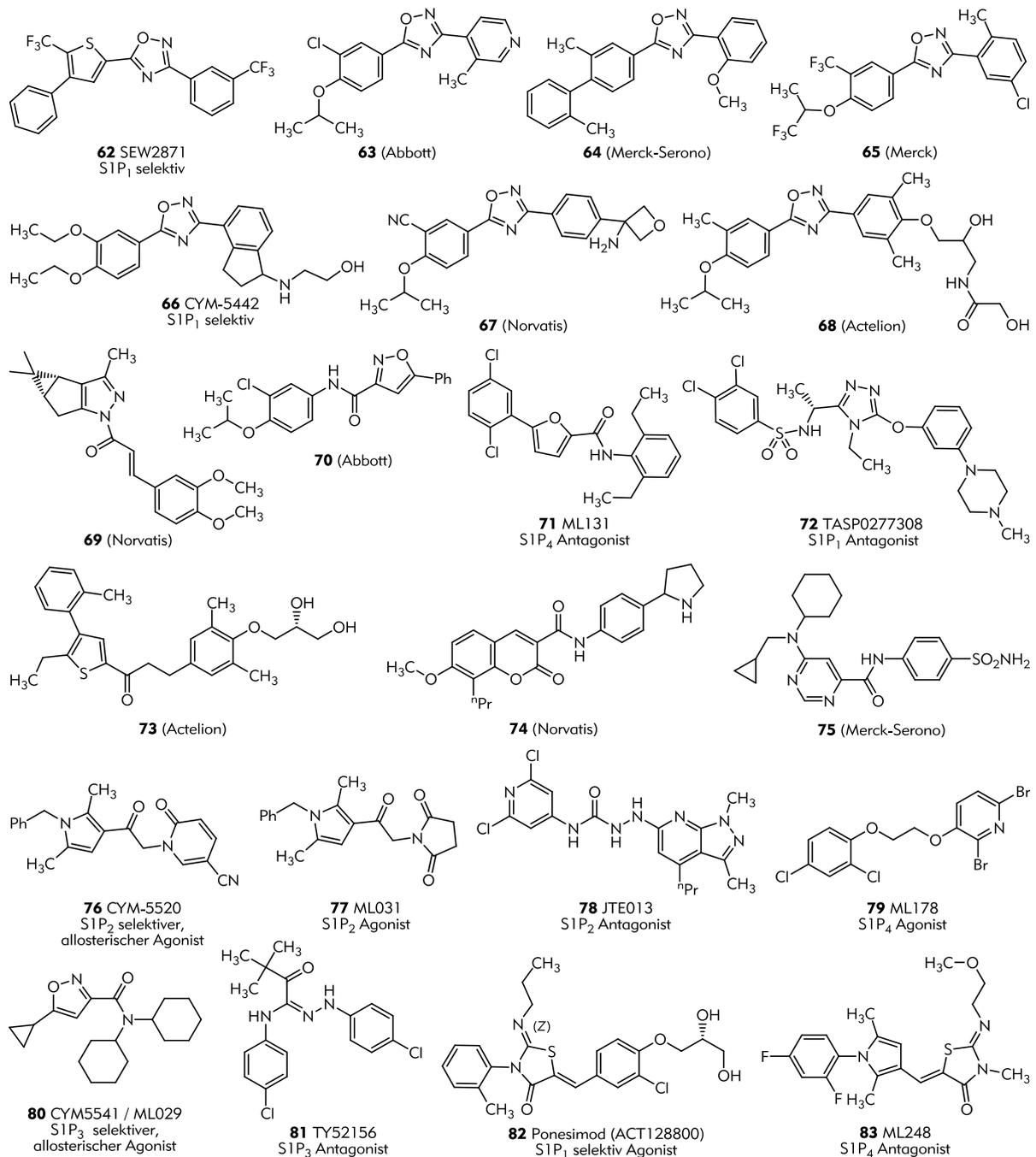


Abbildung 21: Gruppe 2: Neutrale S1P-Liganden ^[78], ^[124], ^[134-152]

Die neutralen S1P-Liganden lassen sich aufgrund ihrer Linker zwischen den Aromaten in zwei Hauptfamilien und in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer ungeladenen Kopfgruppe in jeweils zwei Untergruppen einteilen. Die erste Familie, zu der auch SEW2871 gehört, weist eine triaromatische Grundstruktur auf, deren Zentrum (der Linker) ein 5-gliedriger Heteroaromat ist. Meist handelt es sich dabei um ein 1,2,4-Oxadiazol, wobei es auch Liganden mit 1,3,4-Oxadiazolen, Thiadiazolen oder Oxazolen als Linker gibt. Weiterhin charakteristisch für diese Untergruppe ist das Fehlen einer Kopfgruppe. SEW2871 (**62**) ist der erste S1P₁ selektive, *In vivo* aktive Vollagonist (IC₅₀ = 37 nM)^[78], dessen Struktur in keinsten Weise mit S1P verwandt ist. Daraus ergibt sich, dass die Wasserstoffbrückenwechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen bzw. zwischen dem Aminoalkolphosphat von S1P und den entsprechenden Aminosäure in der Bindetasche des Rezeptor (vgl. Abbildung 23C und Abbildung 24C: Tyr29, Lys34, Ser105 und Arg120) nicht zwingend für einen vollen Agonismus nötig sind. Vielmehr kann der Vollagonismus auch durch Ionen-Dipol-Wechselwirkungen und hydrophobe, aromatische Wechselwirkungen erzielt werden.^[63,101]

In Abbildung 21 sind neben SEW2871 (**62**) sind noch drei weitere 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Strukturen, **63-65**, gezeigt, in denen sich neben dem 4-Phenyl-5-trifluormethyl-2-thienyl-Element weiter privilegierte Elemente finden: 3-(Trifluormethyl)-4-biphenyl, 3-Methyl-4-biphenyl (**64**^[134]), 4-Alkoxy-3-(trifluormethyl)-phenyl (**65**^[135]), 4-Alkoxy-3-chlorphenyl (**63**^[124]), 4-Alkoxy-3-cyanophenyl (**67**) und 3-Methylpyridin-4-yl (**63**). Verbindung **65** zeichnet sich durch eine mehr als 100-fach Affinität von S1P₁ gegenüber S1P₃ aus. Das Biphenylderivat **64** hingegen besitzt sogar als mehr 500-fach größere mit einem EC₅₀ von 4 nM. Bei den Verbindungen vom 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Typ mit ungeladener Kopfgruppe finden sich die unterschiedlichsten Substituenten; vom Amin über 1,3-Diole, Amide, Ethanolamine bis hin zu Sulfonamiden. Dabei befinden sie sich immer in *para*-Position des Aromaten oder im Falle von Bicyklen in 1-Position wie bei CYM-5442 (**66**)^[136]. Das Diazol **66** ist ein selektiver S1P₁-Agonist mit einem EC₅₀ von 1.35 nM.^[64] Viele der Liganden aus der Gruppe der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Typ mit ungeladener Kopfgruppe werden als duale S1P_{1/5}-Liganden beschrieben, wobei der Agonismus an S1P₅ in der Behandlung von MS von vorteilhaft sein soll. **67**^[137] ist so ein dualer Ligand mit EC₅₀-Werten von 10 und 90 nM für S1P₁ bzw. S1P₅ und einer ungewöhnlichen Aminoxetan Kopfgruppe. Die Länge der Kopfgruppen kann sehr unterschiedlich sein. Von einfachen primären Aminen oder Alkoholen bis hin zu Glykolamidderivaten mit einer Länge von mehr als 7 Atomen wie in **68**. Substanz **68**^[138] ist mit einem EC₅₀-Wert von 5.5 nM an S1P₁ zudem hoch affin.^[101]

Die zweite Hauptfamilie der neutralen S1P-Liganden weist unterschiedlichste Linkertypen auf: Amide (**71**), Ether (**72**), Alkane (Propan, Propenon (**69**)^[139]), oder die beiden Ringe sind direkt verknüpft (**70**)^[140]. In Verbindung **69** sind die minimalsten Anforderung von Schürer *et al.*^[153] an einen S1P₁-Liganden vereint: eine planare, hydrophobe oder aromatische Gruppe, ein Wasserstoffbrückenakzeptor und ein (zweiter) aromatischer Ring (Abbildung 22).

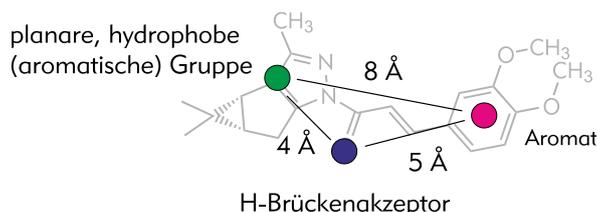


Abbildung 22:^[139] Minimale Strukturanforderungen an einen S1P₁-Liganden nach Schürer *et al.* am Beispiel von **69**

Das Carnen **69** ist ein potenter, selektiver S1P₁-Agonist mit einem EC₅₀-Wert von 25 nM, der auch ein oft wiederkehrendes Strukturmotiv, ein mit einem Aromaten annelliertes Cyclopenten, enthält. Verbindungen **70** und **71** sind Hybriden, da der Linker sowohl aus einem linearen Amid als auch einen 5-gliedrigen Heterozyklus besteht, wobei **71** (ML131)^[141], ein S1P₄-Antagonist ist (IC₅₀(S1P₄) = 89 nM, für S1P_{1,2,3,5} > 25 μM).^[141] TASP0277308 (**72**)^[154] weist eine Etherverknüpfung auf und zählt schon zur zweiten Untergruppe der linearen, neutralen S1P-Liganden, da er eine Methylpiperazin Kopfgruppe besitzt. Substanz **72** ist ein hoch potenter S1P₁-Antagonist mit einem IC₅₀-Wert von 2nM. Unter den linearverknüpften Liganden mit ungeladener Kopfgruppe zeigt sich die gleiche Variabilität dieser (**73**^[142]-**75**). **74**^[143], als Vertreter von Novartis' Chromenon-Serie, zeigt einen EC₅₀-Wert von 0.1 nM, wobei die Serien einen 20-30 fache Selektivität für S1P₁ und einige S1P_{1/4} dualen Liganden enthält. Die hohe Selektivität und Potenz der 6-Amino-4-Pyrimidyl-Serie von S1P₁ zu S1P₃ (EC₅₀(S1P₁) = 2 nM und EC₅₀(S1P₃) = 47500 nM für **75**^[144]) beruht auf dem tertiären Amin am Pyrimidin, besonders dem *N*-Cyclohexyl-*N*-cyclopropylmethylamin.^[101]

Die restlichen Verbindungen in Abbildung 21 (**76-83**) lassen sich nicht eindeutig einer der genannten Familien zuordnen. Außer Verbindung **82** sind sie alle nicht an S1P₁ aktiv. Verbindung **76**^[145] und **77**^[146] wirken beiden selektiv am S1P₂-Rezeptor, **76** jedoch als allosterischer Agonist (IC₅₀ = 1.2 μM)^[146] und **77** als reiner Agonist (IC₅₀ = 1.0 μM).^[64,145] JTE013 (**78**)^[147] ist einer der wenigen bekannten selektiven S1P₂-Antagonisten.^[8,155] ML178 (**79**)^[148] der eine einfache Struktur aufweist, ist ebenso wie und das Iminothiazolidinon Derivat ML248 (**83**)^[152] selektiv am S1P₄-Rezeptor aktiv. Substanz **79** als Agonist mit einer Selektivität größer 1000 (EC₅₀ = 46.3 nM) und **83** als Antagonist mit einer niedrigeren Selektivität und einem EC₅₀-Wert zwischen 38 und 79 nM.^[127] Ein weiteres Agonist/Antagonistpaar ist **80** und **81**, wo bei CYM-5541 (ML029, **80**)^[149] ein allosterischer Agonist mit einem EC₅₀-Wert von 105 nM ist und Selektivitäten von > 400 aufweist.^[149] Das antagonistisch aktive Hydrazonamid **81** (TY52156)^[150] besitzt einen ähnlichen IC₅₀-Wert von 110 nM.^[64] Ponesimod (ACT128800, **82**)^[151] der mehrere klinische Studien, unter anderem eine Phase-II-Studien zu RRMS, abgeschlossen hat, ist ein selektiver S1P₁-Rezeptoragonist mit einem EC₅₀-Wert von 5 - 9.1 nM.^[64]

ONO-4641 und RPC1063 sind ebenfalls beides Liganden für S1P-Rezeptoren, die sich in klinischen Phasen-II-Studien zu MS bzw. zu RRMS und ulceativer Colitis befinden. Für beide ist noch keine Struktur veröffentlicht.^[24] ONO-4641 ist ein an S1P₁ und S1P₅ selektiver Agonist mit EC₅₀-Werten von 0.03 nM bzw. 0.3 μM.^[156] RPC1063 hingegen ist selektiv nur am S1P₁-Rezeptor aktiv.^[24]

2.2.7 Bindungsmodus an S1P-Rezeptoren

Die Kristallstruktur (pdb: 3v2y) des S1P₁-Rezeptors hat neben den vielen Ligand-Bindungs-tasche-Studien viel zum Verständnis der Bindung von Liganden am Rezeptor beigetragen und ist für die Entwicklung neuer Liganden von großem Nutzen.^[24,63,153]

Die S1P-Rezeptoren bestehen wie alle GPCRs aus sieben transmembranäre Helices, deren strukturelle Anordnung bei allen Subtypen konserviert ist. Die Helices II und III, IV und V und VI und VII bilden in der extrazellulären Region drei Loops (ECL1-3) aus, die den Eingang zur amphipatische Bindungstasche formen (Abbildung 23), welche bei den fünf Subrezeptoren eine hohe Sequenzhomologie aufweist. Die Bindetasche ist vom N-Terminus durch einen helikale Deckel verschlossen, der auch bindende Wechselwirkungen eingeht.^[63,64]

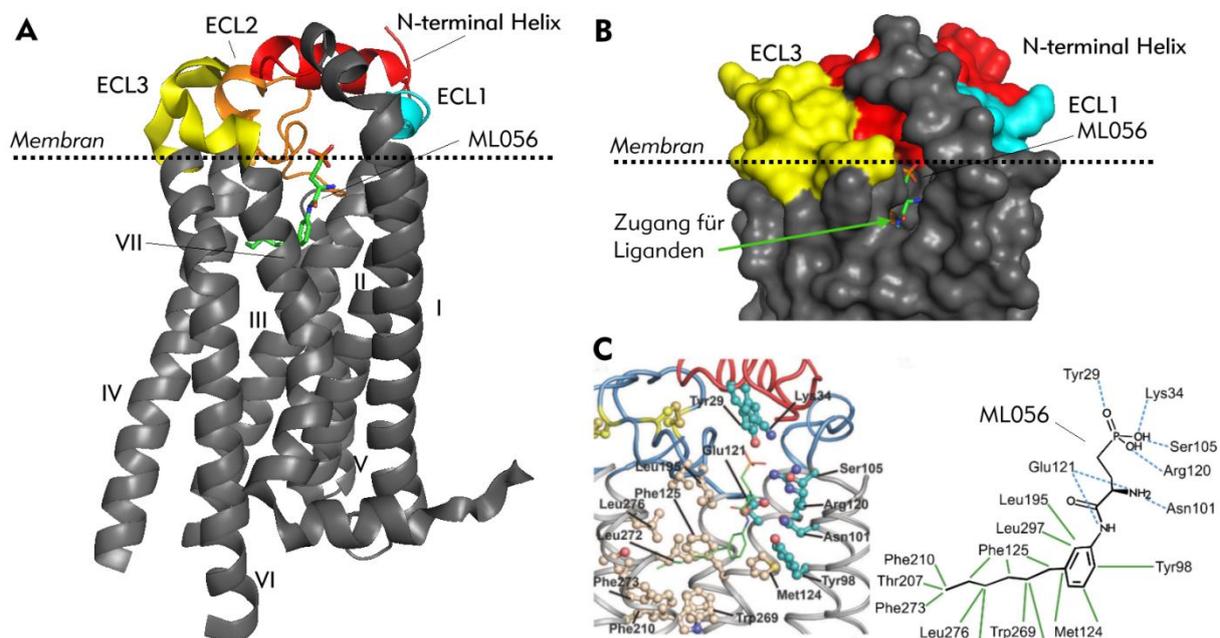


Abbildung 23 (modifiziert nach ^[63]): **A**: Kristallstruktur (pdb: 3v2y) des S1P₁-Rezeptors mit dem selektiven Antagonist ML056 ((*R*)-3-Amino-4-(3-hexylphenylamino)-4-oxobutylphosphonsäure); **B**: Oberflächendarstellung des S1P₁-Rezeptors im Bereich der Membran; **C**^[63]: Bindetasche mit Aminosäurewechselwirkungen zu ML056 und ML056 und Aminosäurewechselwirkungen.

Der ECL1 und 2 sind sehr dicht an die N-terminale Helix gepackt, so dass sie diesen, neben dem Deckel, gegen das extrazelluläre Milieu abschirmen und gleichzeitig die großflächige Bindetasche mit ausbilden. Die Bindetasche ist nur durch eine, in der Membran liegende Lücke zwischen Helix I und VII, zugänglich (grüner Pfeil in Abbildung 23B). Liganden müssen zunächst in die äußere Membran eintreten und dann zu dieser Lücke diffundieren um an den Rezeptor binden zu können. Dies erklärt auch, warum S1P und andere S1P₁-Liganden eine langsame Sättigung bei Ligandenüberschuss zeigen und warum das Signalling bei Aktivierung so langlebig ist.^[63,64]

Die amphipatische Bindetasche der S1P-Rezeptoren spiegelt die Eigenschaften des natürlichen, zwitterionischen Liganden S1P wieder. Dabei gibt es zwei verschiedenartige Bindungsstellen im Rezeptor, eine für die polare Kopfgruppe und eine für den lipophilen Rest. Die polare, zwitterionische Kopfgruppe ist von einem Ring aus positiven und polaren Aminosäureresten der Helices III und VII, ECL2 und des N-terminalen, helikalen Deckels umgeben. Glu121, Arg120, Asn101, Tyr29 und Lys34 sind dabei die wechselwirkenden Aminosäuren (Abbildung 23C). Der lipophile Rest findet in einer Umgebung aus aromatischen, hydrophilen Aminosäureresten der Helices III,

V, VI und VII, als auch ECL2, Platz. Die meisten Aminosäuren, die diesen Teil der Bindetasche formen, sind neben Aminosäure mit kurze, aliphatische Resten, auch vier aromatische Aminosäuren, die für spezifische Wechselwirkungen verantwortlich sind. Diese an der Bindung und auch am Signalling beteiligten Aminosäurereste, halten die Alkylkette von ML056 durch selektive, hydrophobe Wechselwirkungen (vgl. Abbildung 23C) in einer definierten Konformation, in einem Energieminimum und lassen die inhärente Flexibilität von langen Alkylresten nicht zu.^[63,64]

Der Bindungstasche des Alkylrests wird eine Schlüsselrolle beim Wechsel zwischen Agonismus zu Antagonismus zugeschrieben. Sie wird als antagonistische Insel bezeichnet - wird sie vollständig durch einen Alkylrest bedeckt, so liegt Agonismus vor. Dies wird auch durch das Verhalten von ML056-Derivaten bestätigt. *Para*-substituierte Derivate von ML056 sind, wie Fingolimod und auch S1P, S1P₁-Agonisten, genauso wie eine Kettenverlängerung von ML056 einen Wechsel von Antagonist zu Agonist bewirkt. Durch Dockingexperimente konnte gezeigt werden, dass Agonisten dieses Strukturtyps nicht in die Bindetasche, die sich aus der Kristallstruktur von S1P₁ und dem Antagonisten ML056 ergibt, passen. Damit zwischen diesen Agonisten und S1P₁ eine Bindung, unter Aufrechterhaltung der Wechselwirkungen zwischen zwitterionische Kopfgruppe und den Aminosäuren des Rezeptors, möglich ist, muss sich die Bindetasche, aufgrund des großen Volumens der *para*-Substitution, vergrößern. Dabei müssen sich die Aminosäure Phe273, Trp269 und Phe125 bewegen, um den benötigten Platz zu schaffen. In dieser größeren Bindetasche finden auch Agonisten wie SEW2871 (**62**) Platz. Die Bewegung und die damit verbunden Vergrößerung des Volumens der Bindetasche scheint auch einen Einfluss auf das Signalling des Rezeptor zu nehmen.^[63,64]

Zwei Klassen an S1P₁-Agonisten

Aufgrund ihrer Bindungseigenschaften werden die S1P₁-Agonisten in zwei Klassen einteilen. Klasse 1 Liganden besitzen oder imitieren die zwitterionische, polaren Kopf wie zum Beispiel Fingolimod. Aufgrund der Dipolwechselwirkungen gehören auch Verbindungen wie SEW2871 (**62**) zu den Klasse 1 Liganden, obwohl sie nicht lipidähnlich sind. Klasse 2 Liganden (wie CYM-5542, **66**) hingegen, bilden keine Wechselwirkungen zu den Aminosäuren aus, die für die Bindung der zwitterionischen Kopfgruppe der Klasse 1 Liganden zuständig sind (unter anderem Arg120 und Glu121). Sie wechselwirken durch andere, spezifische Bindungen im Bereich der hydrophilen Bindetasche. Dabei scheinen nur aromatische Wechselwirkungen, z.B. π - π -Interaktionen von Trp269, und nicht nur einfache hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung spezifisch zu machen, wie durch Mutationsversuche nachgewiesen werden konnte.^[63,64]

Diese Einteilung in Ligandenklassen deckt sich nicht mit der Einteilung in Gruppen und Unterfamilien wie in 2.2.6.2 S1P-Rezeptorliganden - diese beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit. Die Klasseneinteilung beruht auf Aminosäurewechselwirkung, die durch Mutationsversuche nachgewiesen werden müssen. Der Agonist CYM-5442 (**66** (2-(4-(5-(3,4-Diethoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-ylamino)ethanol), vgl. Abbildung 21) fällt wie SEW2871 (**62** (5-(4-Phenyl-5-(trifluor-methyl)thiophen-2-yl)-3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol)) in die Gruppe 2, da sie beide keine zwitterionische, geladenen Kopfgruppe aufweisen. SEW2871 (**62**) imitiert diese jedoch durch Ionen-Dipol-Wechselwirkungen zu den entsprechenden Aminosäuren. CYM-5442 (**66**) weist eine polare Kopfgruppe auf, die jedoch keinerlei Wechselwirkungen zu diesen Aminosäuren eingeht. Das Fehlen der zwitterionischen Kopfgruppe bzw. Strukturen, die diese imitieren, bewirkt, dass sich diese Liganden in einer anderen Art und Weise in der Bindetasche anordnen, wobei sie sich entgegengesetzt zu der Bindungsstellen für die zwitterioni-

schen Kopfgruppe, anordnen. CYM-5442 (**66**) hat folglich einen anderen Bindungsmodus, obwohl er mit SIP kompetitiv^[64] um die Bindung konkurriert (vgl. Abbildung 24). Dieses Verhalten ist dem Überlappen der orthosterischen Bindung im hydrophoben Bereich der Bindungstasche geschuldet. Liganden, die einen solchen Bindungsmodus aufweisen zählen zu Klasse 2 Agonisten. Sie sind auf die spezifische Wechselwirkung zu Trp269 angewiesen.^[63,64]

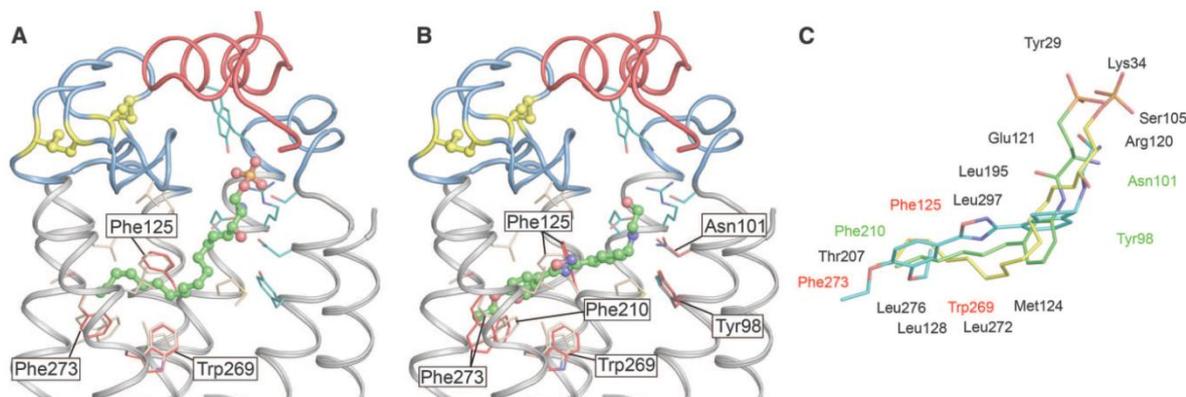


Abbildung 24^[63]: **A:** Docking von S1P in die agonistische Bindetasche des modellierten S1P₁-Rezeptor; **B:** Docking von CYM-5442 (**66**) in die agonistische Bindetasche des modellierten S1P₁-Rezeptor; **C:** Überlappung der gedockten Strukturen von S1P (gelb) und CYM-5442 (blau) zusammen mit der antagonistischen Struktur von ML056 aus der Kristallstruktur (grün), Aminosäuren in schwarz erfahren keine Änderung beim Übergang von Agonist zu Antagonist, solche in rot verändern sich für Agonisten und solchen in grün verändern sich bei Agonist wie CYM-5442 (**66**).

Durch die Kristallstruktur, den anderen Bindungsmodus von Klasse 2 Liganden und dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der einzelnen Subrezeptoren können spezifische Aminosäuren ausgemacht werden, die für die Rezeptorselektivität verantwortlich sind. Tiefer in der hydrophoben Bindetasche findet sich im S1P₃-Rezeptor ein Phe263 statt des Leu276 in S1P₁, das sterische ungünstige Wechselwirkungen mit Klasse 2 Liganden hervorruft. Durch die jeweiligen Mutanten konnte gezeigt werden, dass S1P₁-selektive Liganden in der Leu276Phe-Mutante keinerlei Aktivität mehr aufwiesen.^[157] Dieser Aminosäureaustausch scheint bei den beiden am nächsten verwandten Rezeptorsubtypen S1P₁ und S1P₃, mit einer 50%igen Identität und über 70%igen Übereinstimmung der Sequenz, den Unterschied in der Selektivität auszumachen.^[153] Dass Fingolimod-Phosphat keine Aktivität an S1P₂-Rezeptoren zeigt, kann durch sterische Wechselwirkungen zwischen Phe274 in S1P₂ und der Alkylkette erklärt werden. An Position 274 befindet sich in allen anderen Rezeptoren ein Leucin. Der S1P₁- und S1P₄-Rezeptor unterscheiden sich durch Met124 in S1P₁ und Leu125 in S1P₄. Im S1P₅-Rezeptor findet sich in der Bindungsregion keine spezifische Position, die sich von den anderen Subrezeptoren, was durch die duale Aktivität vieler Liganden bestätigt wird.^[63,64]

Nutzt man die Vorteile der spezifischen aromatischen Wechselwirkungen im hydrophoben Teil der Bindungstaschen und vermeidet somit die zwitterionischen Wechselwirkungen, wie es bei Klasse 2 Liganden der Fall ist, ist aufgrund der Formkomplementarität in den agonistischen Teilen in der Bindungstasche eine höhere Selektivität der S1P₁-Rezeptorliganden möglich. Dies ermöglicht die Entwicklung von selektiven und somit mit potentiell weniger Nebenwirkungen behafteten Liganden.^[63,64]

2.3 Pharmakologische Tools: Molekulares Imaging und Labeling

Die Visualisierung von Molekülen bzw. Enzyme oder Rezeptoren kann in vielen Bereich der Arzneimittelentwicklung und Forschung einen wichtigen Beitrag leisten. Mit pharmakologische Tools kann der Weg, Interaktionen, Akkumulationen, Metabolisierung, Verteilung im Körper und im Gewebe (pharmakokinetischen Aspekte) oder Interaktionspartner von pharmakologisch aktiven Substanzen verfolgt bzw. identifiziert werden. Außerdem können Enzyme oder Rezeptoren direkt sichtbar gemacht und damit auch quantifiziert werden. Neben diesen Beiträgen zur Entwicklung von Arzneimittel können solche Tools auch zum Aufbau von Assay-Systemen, zur Testung von Aktivität von Arzneistoffkandidaten oder als diagnostische bzw. therapeutische Marker für Enzyme oder Rezeptoren, die mit einer Krankheit in Verbindung stehen, genutzt werden (z.B. in klinischen Studien). Sie können in Mausmodellen von Krankheiten zum Einsatz kommen und auch in der Grundlagenforschung helfen, komplexe Zusammenhänge zu verstehen. Dazu sind jedoch selektiv bindende Moleküle mit einer Reportergruppe nötig, die die Visualisierung der Moleküle ermöglichen. Als Reportergruppe können dabei Radioliganden, Fluorophore oder reaktiven Gruppen verwendet werden, die das Wiederfinden des Moleküls erlauben.^[158-162]

Bei der Positronen-Emission-Tomographie (PET) oder der Single-Photon-Emission-Computed-Tomographie (SPECT) muss das spezifisch bindende Molekül mit einen Positron- bzw. γ -Strahlen emittierenden Isotop versehen werden. Hierzu eignen sich zum Beispiel ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{64}Cu , ^{124}I , ^{18}F für PET bzw. $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In oder ^{123}I für SPECT. Der Vorteil von PET und SPECT ist, dass die pharmakologisch aktiven Substanzen nur geringfügig verändert werden. In jedem Fall muss mit radioaktiven Substanzen gearbeitet werden, was bestimmte Regularien und spezielle Arbeitsweisen erfordert und mitunter kostenintensiv ist.^[158,159]

Die Verwendung von optischen Labels bietet dahingehend einige Vorteile. Sie sind relativ einfach zugänglich, sehr variabel, erfordern keine spezielle Handhabung, sind hoch sensitiv, einfach und schnell einzusetzen, bieten die Möglichkeit des high-throughputs und sind mit geringen Instrumentenkosten verbunden. Die Einführung eines Fluorophors kann jedoch die Bindungseigenschaften beeinflussen und sollte daher sorgfältig geplant werden.^[158,160]

2.3.1 Fluoreszenz-Labeling

Mit Fluoreszenz-Labeling bzw. -Imaging ist es möglich, molekulare Prozesse *in vivo* und auch im lebenden Tier (*whole-animal*) zu beobachten. Dabei können neben der Überexpression von Enzymen oder Rezeptoren in bestimmten Krankheitsbildern auch direkte Krankheitsprozesse oder bestimmte Zellen verfolgt bzw. analysiert werden. Auf zellulärer Ebene ist es *in vitro* möglich zelluläre Prozesse, Lokalisation oder spezifische Interaktionen aufzudecken bzw. sichtbar zu machen.^[162-164] Fluoreszenz-Labeling eignet sich besonders zur Erforschung von pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Prozessen. Je nach Anwendungsgebiet bzw. qualitativer oder quantitativer Analysemethoden müssen die Fluorophore bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Neben den Absorption- und Emissionswellenlängen spielen auch physikochemische und physikalische Parameter, wie Quantenausbeute, eine wichtige Rolle.^[158,160,161,165-167]

Zum Einsatz in biologischen Systemen sollten Fluorophore relativ langwellige Absorptions- und vor allem Emissionswellenlängen aufweisen, damit es nicht zu Interferenzen mit der Autofluoreszenz (300-450 nm) von Zellen kommt. Um dieses Problem zu umgehen, werden oft Fluorophore eingesetzt, die rotes Licht oder im nahen Infrarotbereich emittieren. Solche Fluorophore bestehen jedoch intrinsisch aus größeren aromatischen Systemen. Für viele Anwendungen

(z.B. konfokale Mikroskopie) sind außerdem, methodenbedingt, ein großer Stokes-Shift nötig - die Differenz zwischen Absorptions- und Emissionswellenlänge. Zudem wird durch einen großen Stokes-Shift das Self-Quenching der Fluorophore vermindert.^[161,165,166]

Die Fluorophore werden in aktive und aktivierbare bzw. smarte Fluorophore unterteilt. Aktive Fluorophore sind klassische Fluorophore, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und die Energie als Licht mit einer längeren Wellenlänge wieder emittieren. Aktivierbare Fluorophore sind Fluorophore, die im gequenchten Zustand vorliegen und erst durch eine Aktivierung Licht emittieren. Beim Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) sind zwei Fluorophore nahe beieinander angeordnet, so dass sie sich durch strahlungslosen Energietransfer selbst quenchen. Wird der Abstand zwischen Beiden durch z.B. eine Konformationsänderung vergrößert oder wird ein Partner durch eine (Enzym)-Reaktion entfernt, findet das self-quenching nicht mehr statt und die Energie wird in Form von Licht emittiert.^[158,160,168]

Die Energie zur Emission kann auch aus einer biochemischen Reaktion stammen (Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer).^[169] Luciferasen wandeln ein spezifisches Substrat, z.B. Luciferin, chemisch um, wobei die freiwerdende Energie der Reaktion in Form von Licht emittiert wird. Die Reaktion ist meist von Co-Faktoren wie Magnesium, ATP und Sauerstoff abhängig. Luciferasen werden oft in Form von Gen-Reporter-Assays eingesetzt, um Genexpression und zelluläre Vorgänge, die an Genexpression gekoppelt sind und z.B. durch Rezeptoraktivierung ausgelöst werden, zu untersuchen. Die DNA der Luciferase wird dazu durch Klonierung mit dem Gen von Interesse kombiniert. Wird das Gen abgelesen und exprimiert, wird auch die Luciferase exprimiert, die durch Zusatz des Substrats Licht emittiert.^[170,171]

Als Fluorophore werden neben *quantum dots* (anorganische Nanokristalle) und fluoreszierende Proteinen (z.B. GFP) meist organische Moleküle verwendet, die in Form, Größe und Eigenschaften sehr variieren und an das jeweilige Einsatzgebiet angepasst werden können. Bei dem Design von fluoreszenz-gelabelten Liganden muss immer beachtet bzw. überprüft werden, in wie weit das Fluorophor die Bindungseigenschaften des Liganden beeinflusst. Dabei ist es wichtig, den Linker zwischen Fluorophore und Ligand bzw. die Position des Fluorophores am Liganden geschickt zu wählen, um die Bindungseigenschaften minimal negativ zu beeinflussen.^[160,161,165]

2.3.2 Kovalentes Labeling und Photoaffinity-Labeling

Neben fluoreszenzmarkierten, spezifischen Liganden für Rezeptoren oder Enzyme können diese auch reaktive oder aktivierbare Gruppen tragen, die es ermöglichen die Moleküle zu markieren bzw. wiederzufinden. Zudem können solche Liganden als irreversible Inhibitoren eingesetzt werden.^[172-174] Die reaktiven oder aktivierbaren Gruppen gehen dabei entweder direkt nach Bindung (kovalentes Labeling) oder nach Aktivierung durch Licht (Photoaffinity-Labeling) eine kovalente Verbindung mit ihrem Bindungspartner ein. Diese Tools können in Kombination mit enzymatischer Verdauung und Massenspektroskopie zur Charakterisierung von Bindungsstellen oder Bindungspartnern eingesetzt werden.^[174] Dabei sind auch Kombinationen eines kovalenten mit einem Fluoreszenz- oder Radiolabel möglich, die es unter anderem ermöglichen diese Tools zum *target-fishing* einzusetzen.^[175-179]

Beim kovalentem und auch beim Photoaffinity-Labeling, das erstmals 1970 beschrieben wurde^[180], wird ein Ligand, der eine photoaktivierbare oder chemisch reaktive Gruppe trägt, zusammen mit einem Enzym oder Rezeptor inkubiert. Die Ausbildung der kovalenten Bindung erfolgt entweder durch Aktivierung der photoaktiven Gruppe mit Licht oder durch Reaktion einer meist nukleophilen Aminosäureseitenketten mit der reaktiven Gruppe des Labels (Abbildung 25). Danach wird der Proteinkomplex durch enzymatische Verdauung in kleine Fragmente zerschnitten und per Massenspektroskopie analysiert. Die erhaltenen Fragmente werden mit

2.3.2 Kovalentes Labeling und Photoaffinity-Labeling

Fragment aus einem ungelabelten Verdauungsprozess verglichen, so dass spezifische Fragmente, die sich zum Beispiel in der Bindungstasche befinden oder an die der Ligand in einer Proteinmischung gebunden hat, durch die zusätzliche Masse des Labels identifiziert werden können.^[175,176,181]

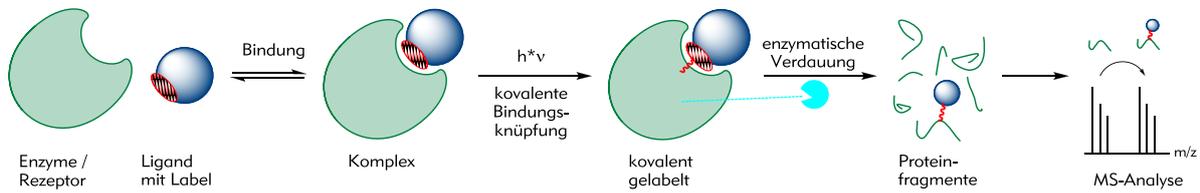


Abbildung 25: Schematische Darstellung von kovalentem und Photoaffinity-Labeling mit MS -Analyse^[177]

Als reaktive Gruppen für das kovalent Labeling eignen sich u. a. Acrylamid-Derivate, α -Bromketone oder Maleimide. Sie können mit Thiolgruppen von Cysteinen oder auch anderen nukleophilen Aminosäuren in der Seitenkette eines Enzyms oder Rezeptor in einer Michael-Addition bzw. S_N2 -Reaktion eine kovalente Bindung eingehen (Abbildung 26). Hierbei müssen sich die Nukleophile bzw. die Cysteine jedoch in unmittelbarer Nähe zu der reaktiven Doppelbindung befinden.^[182-184]

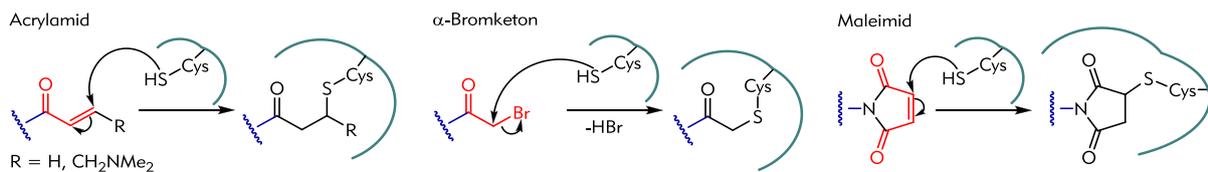


Abbildung 26: Reaktive Gruppen für kovalentes Labeling sowie Thiolreaktion und Reaktionsaddukte

Die photoaktiven Gruppen sind nicht nur auf die Reaktion mit Cysteinresten beschränkt, da sie durch Bestrahlung mit Licht Carbene oder Radikale bilden, die mit einer Vielzahl von Aminosäuresideinketten oder dem Peptidrückrad reagieren können. Phenylazide (vgl. Abbildung 27) bilden bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von ca. 254 nm (abhängig von den Substituenten) Singulett-Nitrene, die sich einerseits zu Keteniminazepinen umlagern können, die dann mit einem Nucleophil einen Azepinstruktur ausbilden. Andererseits kann sich das Singulett-Nitren direkt in eine Wasserstoff-Kohlenstoff- oder Wasserstoff-Heteroatom-Bindung insertieren. Durch ein Inter-System-Crossing bei 77K kann es sich auch in eine Triplet-Nitren umwandeln, das dann radikalisch ein Wasserstoffatom abstrahiert und anschließend ebenfalls eine Stickstoff-Kohlenstoff- oder Stickstoff-Heteroatom-Bindung ausbildet.^[175,177]

Vorteile der Arylazide sind die relativ einfache synthetische Zugänglichkeit und ihre geringe Größe. Nachteilig ist die Absorptionswellenlänge, da diese mitunter Enzyme und Proteine beschädigen kann.^[185]

Diazirine, bei denen das Aryltrifluormethyldiazirin am häufigsten Verwendung findet, bilden bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von ca. 360 nm (abhängig von den Substituenten) entweder direkt, unter Stickstoffabspaltung, oder über eine Diazo-Zwischenstufe ein Singulett-Carben. Das Carben reagiert dann sofort mit einer Wasserstoff-Kohlenstoff- oder Wasserstoff-Heteroatom-Bindung.^[175,177] Diazirine haben den Vorteil, dass sie chemisch und thermisch relativ stabil sind und etwas reaktiver sind als Arylazide. Dafür ist ihre Synthese aufwendiger und sie können durch ihre Größe die Bindung negativ beeinflussen.^[185]

2.3.2 Kovalentes Labeling und Photoaffinity-Labeling

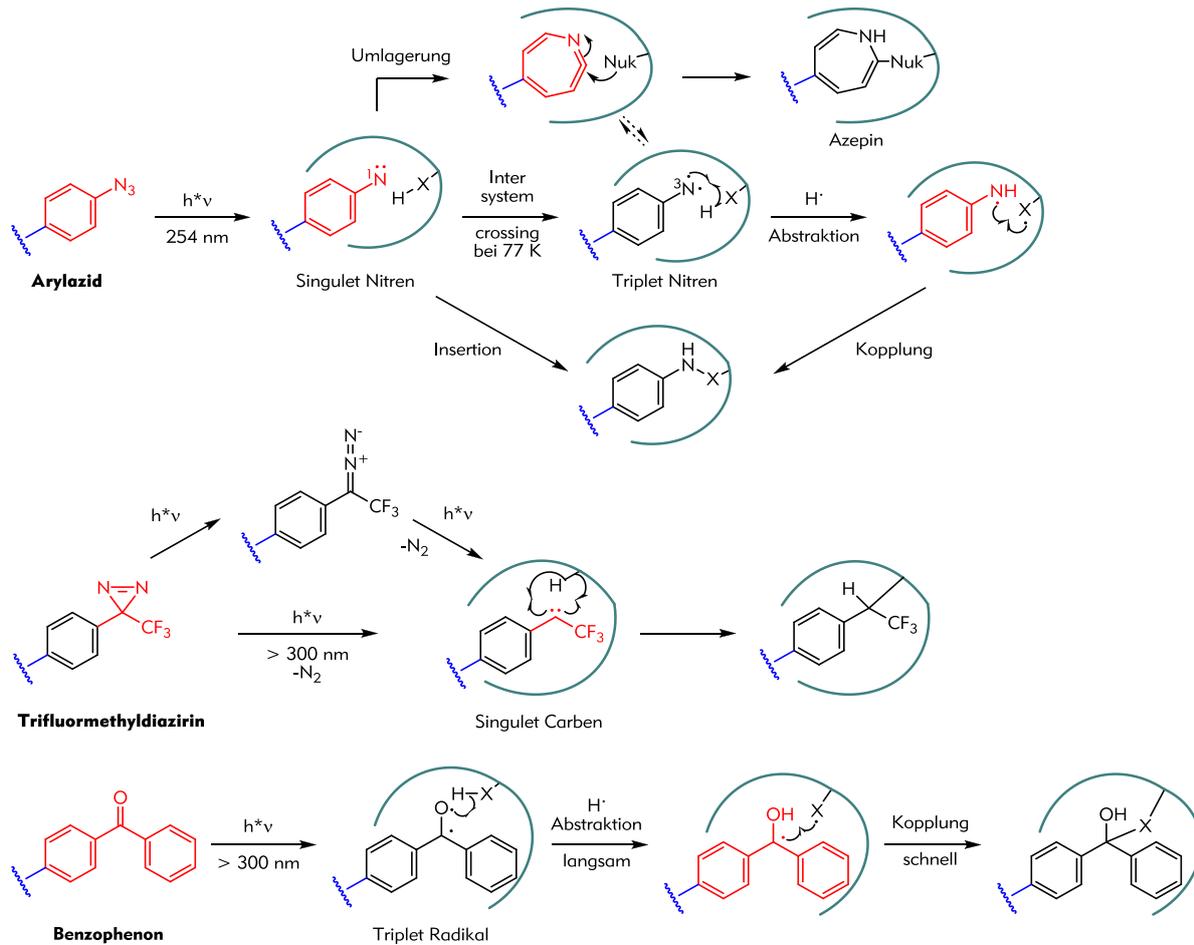


Abbildung 27: Photoaktive Gruppen, ihre reaktiven Spezies und deren Reaktionen zu Reaktionsaddukten ($X = S, O, NH, CH_2/3$; Nuk = Nukleophil) nach^[175,186,187]

Benzophenone reagieren ebenfalls über einen radikalischen Mechanismus. Nach Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge größer von ca. 350 nm bildet sich das kurzlebige Triplet Radikal (ca. 300 ns, sofern kein Wasserstoffatom vorhanden ist)^[177], das langsam ein Wasserstoffatom in einem Radius von ca. 3.1 \AA ^[186] abstrahiert. Die Reaktivität gegenüber Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindung wird wie folgt angegeben: $NCH_x > SCH_x > \text{Methin} > C=CCH_2 > -CH_2- > -CH_3$. Dabei sind elektronenreiche, tertiäre Wasserstoffatome wie in das γ -H in Leucin, das β -H in Valin und Wasserstoffe von CH_2 -Gruppen in Nachbarschaft zu Heteroatomen (Lysin, Arginin und Methionin) besonders reaktiv. Die Insertion in vinylische und aromatische C-H-Bindungen tritt nicht auf. Das entstehende tertiäre Radikal reagiert rasch mit dem verbliebenen Radikal (vgl. Abbildung 27).^[175,177,187]

Benzophenone sind zwar relativ groß, weisen aber eine erhöhte chemische und eine größere Stabilität gegenüber Sonnenlicht auf. Sie reagieren schlechter in nicht entgastem Lösungsmittel, da die Triplet-Radikale schnell mit Sauerstoff abreaktieren.^[185-187]

Welche photoaktive Gruppe Verwendung findet, muss für jeden Zweck einzeln entschieden werden, wobei die Labelingausbeute für alle Derivate immer mit bis zu 70% angegeben wird. Es ist jedoch zu beachten, dass sich in allen Fällen in unmittelbarer Umgebung zur reaktiven Gruppe ein geeigneter Reaktionspartner befinden muss, da die reaktive Spezies sonst mit dem Lösungsmedium abreaktiert.^[175,177]

2.4 5-Lipoxygenase

Das Enzym 5-Lipoxygenase (5-LO) gehört zur Familie der Lipoxygenasen (LOX), die Doppelbindungen in Lipidmoleküle, unter Verwendung von Sauerstoff zu Peroxiden und weiter zu Epoxiden oxidieren. Die zweistufige Oxidation wird dabei regio- und stereospezifisch vom einem nicht-heme gebundenen Eisen-II-Ion katalysiert. LOX finden sich neben Säugern auch in allen anderen Lebensformen wie Pflanzen, Pilzen, wirbellosen Tieren und Bakterien.^[188] Als eine von sechs menschlichen Lipoxygenasen (5-LO, 8-LO, 12-LO (R und S), 15-LO (R und S)) wird die 5-LO hauptsächlich in Leukozyten exprimiert - Polymorphonukleare Leukozyten (PMNL), Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Schaumzellen des arteriosklerosen Gewebes und in Langerhanszellen der Haut. Die 5-LO nimmt eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Leukotrienen (LT) ein (Abbildung 28). LT sind Entzündungsmediatoren, die sich durch einen schnellen und kurzzeitigen Effekt auszeichnen. Diese Effekte werden neben anderen Signalwegen durch GPCRs, BLT1/2 für LTB₄ und CysLT1/2 für Cys-LT, vermittelt. Die durch die 5-LO generierten LT nehmen unter anderem Einfluss auf die Gefäßpermeabilität und spielen bei Asthma, Arteriosklerose, chronischen Entzündungen, Psoriasis und dem Wachstum und Überleben von Krebszellen eine Rolle. Antagonisten des CysLT1-Rezeptors werden in der Behandlung von Asthma eingesetzt.^[20,189-192]

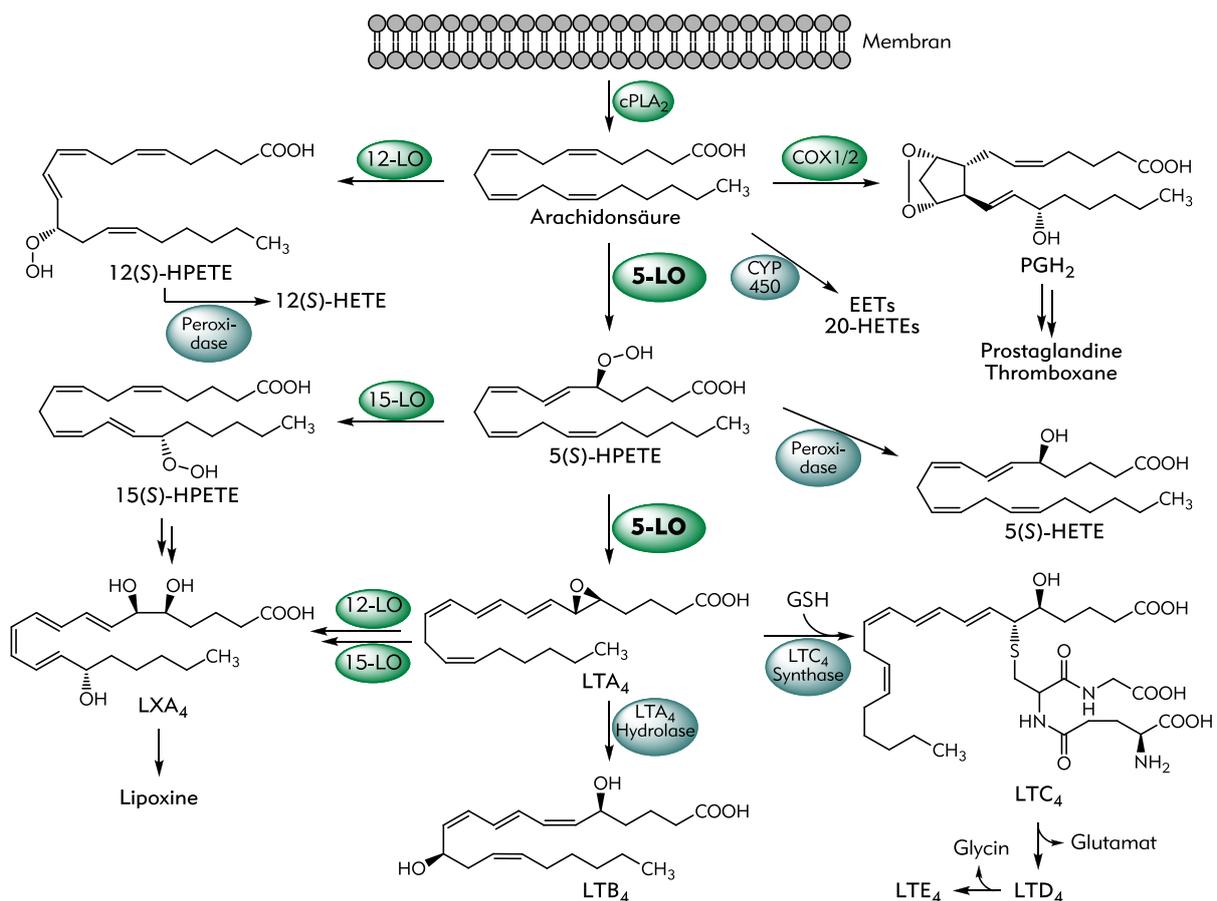


Abbildung 28: Arachidonsäure-Metabolismus: cPLA₂ = zytosolische Phospholipase A₂, COX = Cyclooxygenase, CYP450 = Cytochrom P450, HPETE = Hydroperoxyeicosatetraensäure, HETE = Hydroxyeicosatetraensäure, EET = Epoxyeicosatetraensäure, PGH₂ = Prostaglandin H₂, LXA₄ = Lipoxin A₄, GSH = Glutathion, LTA₄/B₄/C₄/D₄/E₄ = Leukotrien A₄/B₄/C₄/D₄/E₄, nach^[11,20].

Neben der Umsetzung von Arachidonsäure durch 5-LO bzw. 12-LO kann sie auch durch Cyclooxygenasen (COX) in PGH₂ und weiter zu den Prostaglandinen und Thromboxanen oder durch das Cytochrom P450-System zu EETs und 20-HETEs umgewandelt werden.^[11]

2.4.1 Katalytischer Mechanismus

Die Lipoxygenase-Reaktion beginnt mit einer stereospezifischen Wasserstoffabstraktion an C-7. Das Wasserstoffradikal reduziert dabei das aktive Eisen-III-Ion zum inaktiven Eisen-II-Ion. Zuvor muss das inaktive Fe^{2+} durch zelleigene Hydroperoxide, die durch Glutathionperoxidase reguliert werden, zur aktiven Fe^{3+} -Form oxidiert werden. Das entstehende Radikal rekombiniert mit einem Elektron der benachbarten Doppelbindung zu einer 6-*trans*-Doppelbindung. Das nun an Position 5 befindliche Elektron reagiert antrafacial mit molekularem Sauerstoff. Dabei dient die Position der Oxygenierung der LOX-Klassifizierung (C-5 \rightarrow 5-LO). Das entstandene Peroxidradikal oxidiert das Eisen-II-Ion wieder in seine aktive Form (Fe^{3+}) und das Anion reagiert mit einem Proton zu 5(S)-HPETE (Abbildung 29).^[20,191,193]

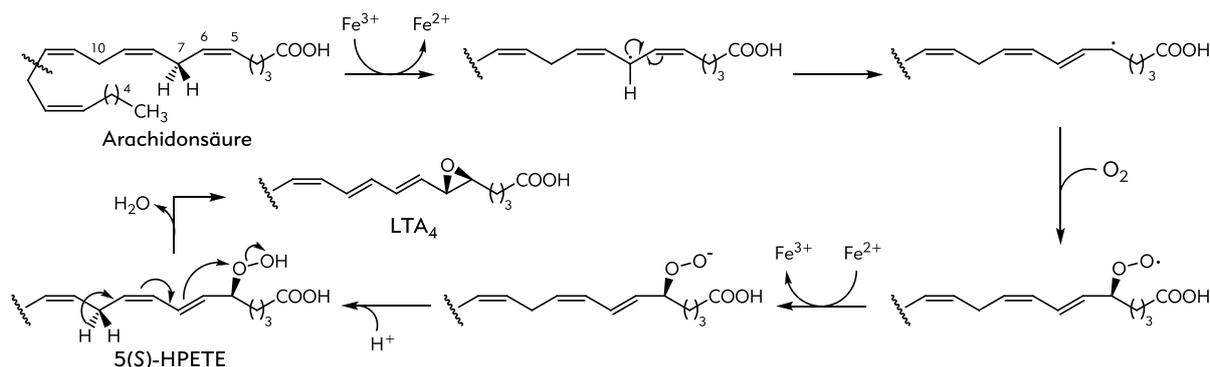


Abbildung 29: Mechanismus der Bildung von 5(S)-HPETE und LTA_4 aus Arachidonsäure nach^[20,193]

Der *pro-R*-Wasserstoff an C-10 von 5(S)-HPETE wird radikalisch abgespalten, wobei Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert wird. Das entstehende 5(S)-HPETE-Radikal oxidiert Fe^{2+} zu Fe^{3+} und das Anion lagert sich unter Ausbildung zwei neuer *trans*-Doppelbindungen an C-9 und C-7 sowie des Epoxid an C-5 zu LTA_4 um. Die Bildung von 5(S)-HPETE und LTA_4 erfolgt dabei in konzertierter und funktional gekoppelter Weise in der 5-LO.^[20,191,193]

2.4.2 Expression und Regulation

Das ALOX5-Gen, das auf Chromosom 10 lokalisiert ist, weist in der Promotorregion ein typisches Muster für Housekeeping-Gene auf, weshalb es zu einem bestimmten Spiegel ständig exprimiert wird. Durch DNA-Methylierung des Promotors wird das Ablesen und somit die Expression von 5-LO in nicht-5-LO-exprimierenden Zellen unterbunden. In reifenden Leukozyten ist die 5-LO-Expression gesteigert, wobei aber keine Veränderung der DNA-Methylierung stattfindet. Induziert werden kann die Expression von 5-LO durch DMSO, Retinsäure, und allgemein durch Cytokinen und Wachstumsfaktoren wie $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin-D}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor β) und GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen colony-stimulierender Faktor). In verschiedenen Zellarten konnte durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und TGF- β eine ca. 100-fach Induktion an 5-LO festgestellt werden. Vor allem unter pro-entzündlichen Bedingungen findet eine vermehrte Expression von 5-LO statt. Bei kardiovaskulären Erkrankungen wird in der arteriosklerotischen Gefäßwand eine erhöhte 5-LO Expression festgestellt, die unter anderem durch TGF- β vermittelt wird. In dendritischen und T-Helferzellen wird die Expression von 5-LO durch z.B. Interleukin 4 hochreguliert.^[189,190]

In verschiedenen Krebszellen, z.B. Prostatakrebs, kann eine erhöhte 5-LO-Konzentration gemessen werden und sie ist teilweise in epithelialen Tumorzellen zu finden. Die 5-LO-Metabolite scheinen als autocrine Wachstumsfaktoren zu fungieren, wohingegen sie sonst in paracrinere Weise auf das sie umgebende Zellmilieu wirken.^[20,189,190]

2.4.3 5-LO Enzym

Die menschliche 5-LO (EC 1.13.11.34) besteht aus 673 Aminosäuren und liegt in monomerer Form mit zwei Domänen vor. Die kleinere N-terminale Domäne (Aminosäure 1-114, orange in Abbildung 30) nimmt eine C2-ähnliche β -Sandwich Konformation mit typischen Ligandbindungsloops an. In diesem Bereich der Loops bindet zum einem das für die Aktivierung der 5-LO nötige Calcium²⁺ und zum anderen bindet die 5-LO über sie an die Kernmembran. Die Aminosäuren 121-673 bilden die große katalytische, C-terminale Domäne (grün in Abbildung 30), die das nicht-heme gebunden Eisen (rot) beherbergt und größtenteils helikale Strukturen aufweist.^[20,189,190,194]

Bis 2011 existierten nur Homologiemodelle auf Basis der bis dahin gelösten Kristallstrukturen der 15S-LO (Hase), 8R-LO (Koralle), und zweier LOX-Isoformen aus der Sojabohne. Durch Mutationen einer lysinreichen Region am C-Terminus, der Calcium²⁺- und Membranbindungsstelle, sowie dem Austausch zweier Cysteine gegen Alanin konnten Gilbert *et al.*^[194] eine stabilisierte 5-LO zur Kristallisation bringen (Abbildung 30).^[20,194]

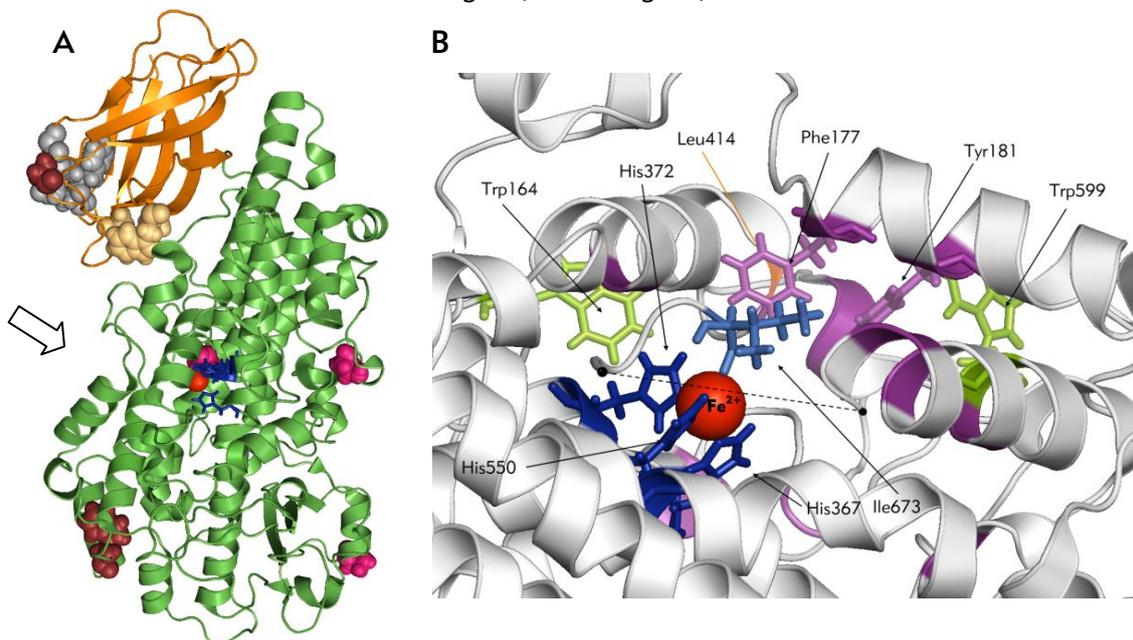


Abbildung 30: **A)** Kristallstruktur (pdb: 3O8Y) der stabilisierten 5-LO (grau: Ca²⁺-Bindungsstellen, beige: Membran-, PC-, OAG-, und CLP-Bindungsdomäne, kupferfarben: ATP-Bindungsdomäne, pink: Phosphorylierungsstellen). **B)** Blick ins katalytisches Zentrum aus Pfeilrichtung (gestrichelte Linie: aus Übersichtsgründen nicht dargestellter loop).^[194]

Die Kristallstruktur (pdb: 3O8Y) zeigt, dass das Eisen-II-Ion, wie schon durch Mutationsexperimente gezeigt wurde, durch drei konservierte Histidine (His550, His367, His372), wie sie sich in vielen nicht-heme Eisen-Enzymen finden, sowie durch das C-terminale Ile673 koordiniert wird (blau Abbildung 30 rechts). Dabei haben Elektron paramagnetische Resonanzstudien (EPR) gezeigt, dass das Eisen in aufgereinigter 5-LO als Eisen-II vorliegt und somit erst durch Aktivierung bzw. Oxidation in die aktive Eisen-III-Form überführt werden muss. Von Leu414 (orange in Abbildung 30) wird angenommen, dass es den Eintritt von Sauerstoff kontrolliert. Die Bindetasche (663Å³) ist länglich und wird durch in Abbildung 30 lila gefärbten Aminosäure definiert. An einem Ende wird sie durch Phe177 und Tyr181 und am anderen durch Trp164 verschlossen. Damit das Substrat Arachidonsäure ins aktive Zentrum gelangen kann, muss sich ein Ende öffnen. Ein angenommener Mechanismus ist eine Öffnung von Phe177 und Tyr181 und/oder eine Rotamerbewegung von Trp599. Oder Trp164 könnte durch Drehung den Weg ins aktive Zentrum freigeben. Je nach Mechanismus muss die Arachidonsäure einmal mit der Säurefunktion und das andere Mal mit dem Alkylende in die 5-LO eindringen.^[20,190,194]

2.4.4 Stimulation und Regulation der 5-LO

Die 5-LO wird durch vier Faktoren, Ca^{2+} , PC (Phosphatidylcholin), OAG (Oleoyl-2(S)-acetylgllycerol), CLP (Coactosin-like Protein) sowie durch Phosphorylierung stimuliert. Dabei wird angenommen, dass zum einen der Eintritt des Substrates und die Oxidation des Eisen-II zu Eisen-III erleichtert bzw. ermöglicht wird und zum anderen die aktive Struktur der 5-LO durch Bindung der Faktoren stabilisiert wird.^[189-191,193]

Für aufgereinigte 5-LO weisen Ca^{2+} -Ionen einen EC_{50} -Wert von 1-2 μM auf und bei Konzentration von 4-10 μM wird eine vollständige Aktivierung erzielt. Dabei bindet sie pro Molekül zwei Ca^{2+} -Ionen in einem loop des N-Terminus (grau in Abbildung 30: Asn43, Asp44, Glu46). Durch Mg^{2+} -Ionen kann die 5-LO auch aktiviert werden, dabei sind jedoch millimolare Konzentrationen nötig. Da die 5-LO eine basale Aktivität aufweist sind die zweiwertigen Ionen nicht Teil der Katalyse. Es wird vermutet, dass die 5-LO zwei Bindungsstellen für Lipide aufweist – eine katalytische und eine regulatorische. Die regulatorische Bindungsstelle könnte ebenfalls Ca^{2+} -abhängig sein und befindet sich in der β -Sandwichstruktur.^[189-191,193]

Neben Ca^{2+} zur stimulierten Aktivierung der 5-LO ist die Anwesenheit von PC oder CLP notwendig. Die Bindung an eine C2-Domäne (beige in Abbildung 30: W13, W75, W102) kann durch synthetische PC-Vesikel oder CLP imitiert werden. In jedem Fall ist *in vitro* PC für die basal als auch die Ca^{2+} -stimulierte 5-LO-Aktivität nötig. Die Selektivität für PC gegenüber zum Beispiel Phosphatidylserin wird für Wanderung der 5-LO zur Kernmembran verantwortlich gemacht. Dabei stabilisiert die Ca^{2+} -stimulierte Bindung von PC neben der 5-LO auch die Membran, da die Membranbindung allein nicht zur Aktivität führt. Die Bindung von ATP an die 5-LO erhöht ebenfalls die Enzymaktivität, ohne dass ATP gespalten wird. Dies wird auf eine durch die Bindung (an W75 und W201, kupferfarben in Abbildung 30) hervorgerufen Stabilisierung zurück geführt, die ebenfalls Ca^{2+} abhängig ist. Eine erhöhte Fluidität der Membran, wie sie durch höheren Konzentrationen an Arachidonsäure hervorgerufen wird oder wie es in *Lipid Rafts* der Fall ist (vgl. Seite 5), begünstigt die Wanderung der 5-LO zur Membran.^[189-191]

OAG ist eines der potentesten Glyceride, die die 5-LO aktivieren. Es bindet in der gleichen C2-Region wie PC, jedoch ist die Aktivierung unabhängig von Ca^{2+} . Das humane Coactosin-like Protein (CLP) bindet und aktiviert ebenfalls die 5-LO und ersetzt dabei die Funktion von PC. Es wird vermutet, dass zelluläre 5-LO immer im Komplex mit CLP vorliegt. CLP bindet an die 5-LO, jedoch ist wie bei PC Ca^{2+} für die Aktivierung nötig.^[190]

Die Menge an synthetisierten LT hängt neben den genannten Faktoren zum einen von der Aktivität der 5-LO ab und zum anderen von der Menge an Arachidonsäure, die für die 5-LO zugänglich ist. Dabei wird diese durch die zytosolischen Phospholipase A_2 (cPLA₂), welche Arachidonsäure aus der Membran freisetzt, bestimmt. Stimuli für beide Enzyme, die sich in Struktur und Regulation ähneln, sind *N*-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP), Platelet aktivierender Faktor (PAF), opsonisierendes Zymosan (Entzündungsmediator), LTB₄, Immunkomplementkomponente C5a (hoch inflammatorisches Peptid) und Interleukin-8.^[190]

5-LO und cPLA₂ liegen in ruhenden Zellen im Zytosol oder assoziierte an Chromatin im löslichen Teil um den Kern vor. Sie wandern durch Zellstimulation, unter anderem in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration, zur Kernmembran wo cPLA₂ Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Membran freisetzt (s. Abbildung 31). Die freigesetzte Arachidonsäure wird vom membran gebundenen 5-LO-Aktivierende Protein (FLAP (pdb: 2Q7M^[195])) aufgenommen und an die 5-LO weitergegeben. FLAP, das als Homodimer vorliegt, ist essentiell bei der LT-Biosynthese.^[196] Eine Inhibition von FLAP bewirkt auch eine Inhibition der LT Synthese. Zytosolische 5-LO kann in einigen Zelltypen auch Arachidonsäure aus exogenen Quellen direkt in LT umwandeln.^[189-191]

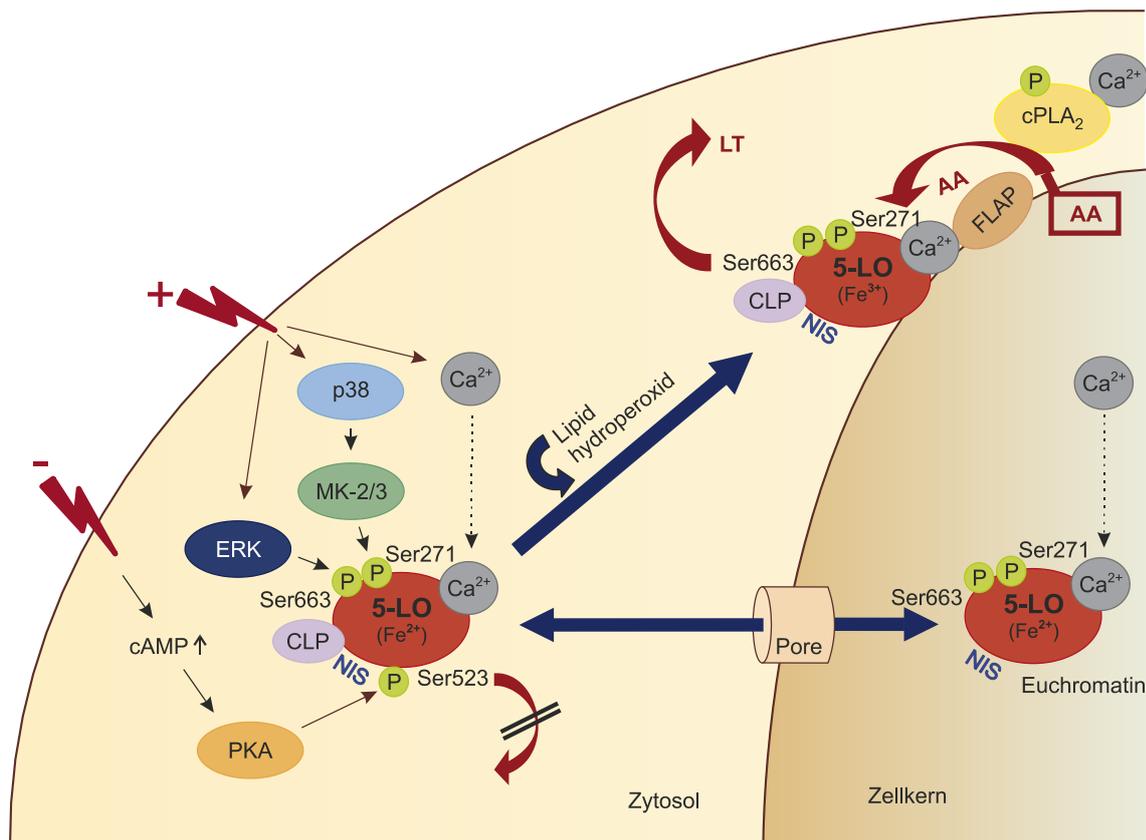


Abbildung 31:^[190] Aktivierung, Regulation und Translokation von 5-LO.

Phosphorylierung der 5-LO ist neben der Ca^{2+} -Konzentration ein wichtiger Faktor, der die Wanderung zur Kernmembran, ihren Im- und Export in den Kern und die LT Synthese reguliert (s. Abbildung 31). 5-LO und auch cPLA_2 werden durch eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration und durch ein Zusammenspiel mit Phosphorylierung aktiviert, wobei auch S1P, C1P, Lactosylceramid und SM in die Aktivierung eingreifen. S1P beeinflusst die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung^[1] und C1P spielt neben anderen Faktoren eine Rolle in der Translokation und Aktivierung von cPLA_2 . Lactosylceramid induziert durch Bindung an die C2-Domäne die Translokation cPLA_2 , wohingegen SM die Translokation inhibiert. SM stört die Bindung von Glycerophospholipiden, die zur Translokation führt.^[10,62,189-191]

Der Kern-Import und -Export wird durch nukleäre Importsequenzen (NIS) vermittelt. Die Phosphorylierung findet an drei Serinen (Ser271, Ser523, Ser663; vgl. Abbildung 31 und Abbildung 30 (pink)) durch unterschiedliche Kinasen statt. Ser271 wird durch MAP-Kinase aktivierte Proteinkinase 2/3 (MK2/3), die durch Proteinkinase p38 reguliert, phosphoryliert. ERK 1/2 (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) phosphoryliert Ser663 am C-Terminus. Ser523 wird durch Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Dabei führt eine Phosphorylierung von Ser271 und Ser663 zu einer Kerntranslokation und gesteigerter LT Bildung, wohingegen die cAMP-abhängige Phosphorylierung von Ser523 durch PKA die Translokation und die Katalyseaktivität unterdrückt. Die gesteigerte LT Synthese wird jedoch nicht durch eine gesteigerte Enzymaktivität verursacht, vielmehr bewirkt die Phosphorylierung eine effiziente Aktivierung des LT-Synthesapparates. Die Phosphorylierung ist dabei durch Bindung von ungesättigten Fettsäuren an eine regulatorische Bindungsstelle stimuliert (s. o.).^[189-191]

Das Redoxmilieu der Zelle bedingt die 5-LO-Aktivität, da das Eisen-II zunächst zum aktiven Eisen-III oxidiert werden muss. Die dazu nötigen Lipidhydroperoxide werden unter anderem von

zellulären, reaktiven Sauerstoffspezies gebildet, die zum Beispiel bei oxidativen Stress entstehen. Glutathionperoxidasen wirken der Oxidation entgegen. HPETEs können im Gegensatz zu freiem Wasserstoffperoxid auch das Eisen-II oxidieren.^[189-191]

2.4.5 (Patho)-/physiologische Effekte von Leukotrienen

LT werden von aktivierten Leukozyten gebildet, ausgeschleust und vermitteln ihre Effekte unter anderem durch spezifische G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Das durch die 5-LO gebildete, instabile LTA₄ wird weiter, in Abhängigkeit des Zelltyps und der Enzyme, die dort exprimiert werden, in LTB₄, LTC₄ und die anderen cysLT oder in Lipoxine umgewandelt.^[20,189-191,197]

Für Neutrophile, Eosinophile und Monozyten stellt LTB₄ einen potenten Chemoattraktant dar, der außerdem zur Adhäsion von Phagozyten an die Gefäßwand, Neutrophildegrenulation und zur Freisetzung von Superoxidanionen führt. Weitere Effekte werden durch die beiden GPCRs BLT₁ und BLT₂ vermittelt. Der BLT₁-Rezeptor wird vornehmlich auf Leukozyten exprimiert, wohingegen der BLT₂-Rezeptor ubiquitär vorkommt.^[198] Über beide Rezeptoren nimmt LTB₄ Einfluss auf die Chemotaxis, wobei vermutet wird, dass das LTB₄-Signalling in Arteriosklerose^[199], bronchialem Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), Glomerulonephritis, (rheumatoider) Arthritis, bei chronischen, entzündlichen Darmerkrankungen (chronic inflammatory bowel disease) und ulcerativer Colitis eine Rolle spielt.^[20,197,200,201]

Die cysLT (LTC₄, LTD₄ und LTE₄) sind hochpotente Bronchokonstriktoren, die die vaskuläre Permeabilität erhöhen und die Schleimsekretion der Atemwege anregen. Es sind zwei GPCRs bekannt, die cysLT binden: CysLT₁ und CysLT₂. Beide werden in den unterschiedlichen Geweben und aus inflammatorischen Leukozyten exprimiert (CysLT₁: glatte Muskelzellen, Lunge, Dünndarm, Bauspeicheldrüse; CysLT₂: vaskuläre und Herzmuskelzellen, Nebennierenmark, zentrales Nervensystem (ZNS)).^[201,202]

Die verschiedenen cysLT weisen dabei unterschiedliche Affinitäten für die beiden CysLT auf. LTD₄ weist am CysLT₁-Rezeptor die potenteste agonistische Wirkung auf (EC₅₀ = 2.5 - 35 nM)^[203]. LTC₄ bindet dabei stärker als LTE₄ wohingegen LTC₄ und LTD₄ am CysLT₂-Rezeptor equipotent aktiv sind. LTE₄ ist hier nur ein schwach agonistisch aktiv. Makrophagenaktivierung, Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibrose werden durch beide Rezeptoren vermittelt. Der CysLT₁-Rezeptor beeinflusst die Gefäßpermeabilität, die Bronchokonstriktion und die Reifung von dendritischen Zellen. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Feststellung, dass in Asthma-patienten die LT-Biosynthese stark erhöht ist, wurden CysLT₁-Rezeptorantagonisten entwickelt und in der Therapie von Asthma eingesetzt (s. Seite 50).^[20,197,200,201]

Lipoxine, die ebenfalls ausgehend von LTB₄ gebildet werden, haben eine entgegengesetzte Wirkung. Sie wirken antientzündlich und fördern die Heilung.^[20,197,204]

Wie oben bereits angedeutet, fungieren LT als Mediatoren in verschiedenen entzündlichen und allergieassoziierten Reaktionen. Unter den entzündlichen Hautkrankheiten wie Psoriasis und atopischer Dermatitis wird ebenfalls eine Beteiligung des 5-LO-Stoffwechsels angenommen. Klinische Studien mit anti-LT-Substanzen konnte bisher keine signifikante therapeutische Wirkung zeigen.^[20,197,200]

Bei den kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Schlaganfall, myokardialer Infarkt und Aortenaneurysma wird dem kompletten 5-LO-Metabolismus inklusive der Rezeptoren eine

entscheidende Beteiligung zugeschrieben, da sie in betroffenen Geweben vermehrt vorkommen und LT dort vermehrt gebildet werden. Zudem wurde die Relevanz durch genetische Studien belegt. Mit LT-Rezeptorantagonisten sowie LT-Synthese Inhibitoren konnte in Studien gute Ergebnisse erzielt.^[20,31,197,199,200]

Auch bei Osteoporose greifen die 5-LO und ihre Produkte in die Knochenbiologie ein. Es hat sich gezeigt, dass sie in negativer Weise den Knochenaufbau regulieren und so die Pathologie und Osteoporose begünstigen.^[20,197]

Viele Beobachtungen deuten daraufhin, dass der 5-LO-Weg auch bei der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen zum Tragen kommt. Obwohl die 5-LO *house-keeping*-Eigenschaften im Gen aufweist, ist ihre Expression auf bestimmte Zellarten beschränkt. In normalem Organewebe bzw. Zellen ist sie nicht nachweisbar, wohingegen sie bei den entsprechenden Krebsarten (Hirn, Brust, Darm, Lunge, Nieren, Bauspeicheldrüse, Prostata) gefunden wird. Dementsprechend sind dort auch die 5-LO-Produkte nachweisbar. Diese Beobachtungen wurden in entsprechend Mausmodellen verifiziert. Neben den Enzymen des 5-LO-Stoffwechsels wird auch FLAP in einigen Krebszelllinien vermehrt exprimiert. Für die einzelnen LT konnte eine Cancerogenese-unterstützende Wirkung nachgewiesen werden, so dass die Antileukotrientherapie einen weiteren Ansatz in der Krebsbehandlung darstellt.^[20,197,200]

Nicht jede Erkrankung lässt sich mit nur einem LT in Verbindung bringen, sondern zeichnet sich eher durch ein Zusammenspiel der verschiedenen 5-LO-Produkte aus. In Abbildung 32 sind einige Erkrankungen aufgelistet, die eher mit dem LTB₄ bzw. der LTA₄-Hydrolase oder mit den cysLT bzw. der LTC₄-Synthase in Verbindung stehen.^[20]

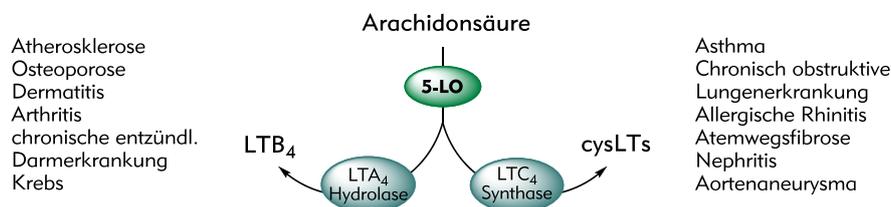


Abbildung 32: Krankheitszuordnung zu jeweils hauptsächlich involvierten LT und Enzymen^[20]

2.4.6 Anti-LT-Wirkstoffe

Aufgrund der Erkenntnisse, die man bezüglich der LT und ihrer Enzyme in Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen erlangt hat, stellt die Entwicklung von pharmazeutisch aktiven Substanzen zur Anti-LT-Therapie schon länger einen potentiellen Ansatz zur Behandlung dieser Erkrankungen dar. Dabei gibt es zwei verschiedene Herangehensweisen: entweder können die Effekte der LT inhibiert oder die entsprechenden Enzyme. Neben Antagonisten für die BLT- und CysLT-Rezeptoren wurden auch Inhibitoren für PLA₂, 5-LO, FLAP, LTA₄-Hydrolase und LTC₄-Synthase entwickelt, wobei die Inhibition der 5-LO präferiert wird. Durch Inhibition der PLA₂ wird nicht nur der LT-Weg unterdrückt, sondern auch der komplette COX-basierte Prostaglandin- und Thromboxanweg. Der Vorteil der 5-LO-Inhibition ist, dass dadurch die komplette LT-Biosynthese, sowohl LTB₄ und cysLT als auch 5-H(P)ETE unterbunden werden kann.^[20,201]

2.4.6.1 Modulatoren der LTA₄-Hydrolase, LTC₄-Synthase und LT-Rezeptorantagonisten

LTA₄-Hydrolase:

Das katalytisch aktive Zinkion der LTA₄-Hydrolase, sowie die Aminopeptidaseaktivität prägten die ersten Entwicklungen von LTA₄-Hydrolase-Inhibitoren. Die ersten identifizierten Inhibitoren Bestatin (**84**), Captopril (**85**), Kelatrophan (**86**) (Abbildung 33) wurden schnell klinisch weiterentwickelt.^[20]

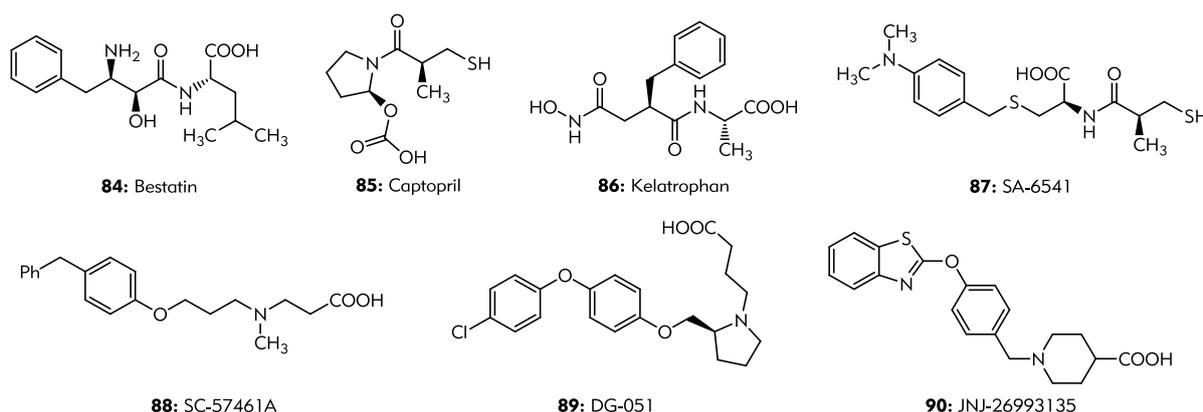


Abbildung 33: LTA₄-Hydrolase-Inhibitoren

SA-6541 (**87**) ist oral aktiver LTA₄-Hydrolase-Inhibitor, der in einigen klinischen Studien gute anti-entzündliche Eigenschaften gezeigt hat.^[205] Ein weiterer klinischer Kandidat, SC-57461A (**88**, IC₅₀ = 49 nM)^[206] gegen chronischen, entzündlichen Darmerkrankung wurde aufgrund von Toxizitätsproblemen nicht weiter entwickelt. Zur Behandlung von myokardialen Infarkt und Schlaganfall wurde DG-051 (**89**, IC₅₀ = 47 nM)^[207] entwickelt und klinisch zur Arterioskleroseprävention untersucht. Die Johnson & Johnson Verbindung **90** (JNJ-26993135) weist einen IC₅₀-Wert von 12 nM auf, ohne die anderen LT-Wege zu beeinflussen, und wurde zur Behandlung von chronischen, entzündlichen Darmerkrankung und allergischer Atemwegsentzündung entwickelt.^[57]^[20]

LTC₄-Synthase:

Die LTC₄-Synthase weist sehr große Homologien mit FLAP auf, wobei auch die Bindungsstellen für Arachidonsäure hohe strukturelle Ähnlichkeiten besitzen. Dennoch existieren nur wenige LTC₄-Synthase-Inhibitoren (Abbildung 34). Der FLAP-Inhibitor MK886 (**91**) inhibiert auch die LTC₄-Synthase bei mikromolaren Konzentrationen. Ähnlich verhält sich **92** (L699333) –

es inhibiert neben der LTC₄-Synthase (IC₅₀ = 22 nM) auch direkt die 5-LO (IC₅₀ = 7 nM)^[208] ^[20]
 Basierend auf der Kristallstruktur^[209] der humanen LTC₄-Synthase und einem *in silico*-Screening wurde **93** als der potenteste Vertreter (IC₅₀ = 1.9 μM) einer Gruppe an selektiven LTC₄-Synthase-Inhibitoren erst 2013 veröffentlicht.^[210]

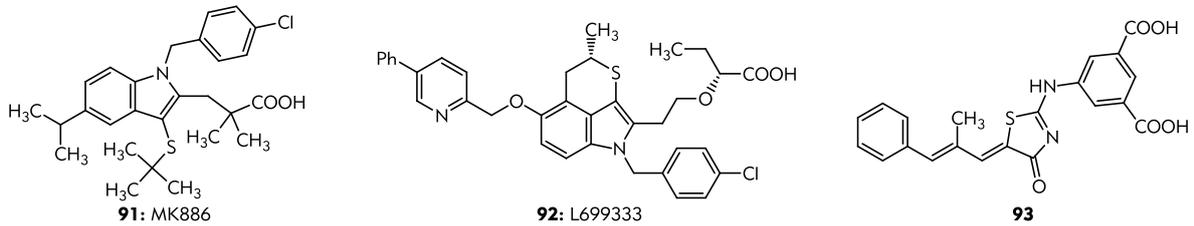


Abbildung 34: Inhibitoren der LTC₄-Synthase

BLT-Rezeptoren:

Für die beiden BLT-Rezeptoren existieren zahlreiche Antagonisten (Abbildung 35), die sich zum Teil in der klinischen Entwicklung zur Behandlung von Entzündungskrankheiten befinden. Die Rolle des BLT₂-Rezeptors ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Da BLT-Agonisten keine klinische Relevanz besitzen, existiert bisher nur ein reiner Agonist – Compound A (**103**).^[20,198,201]

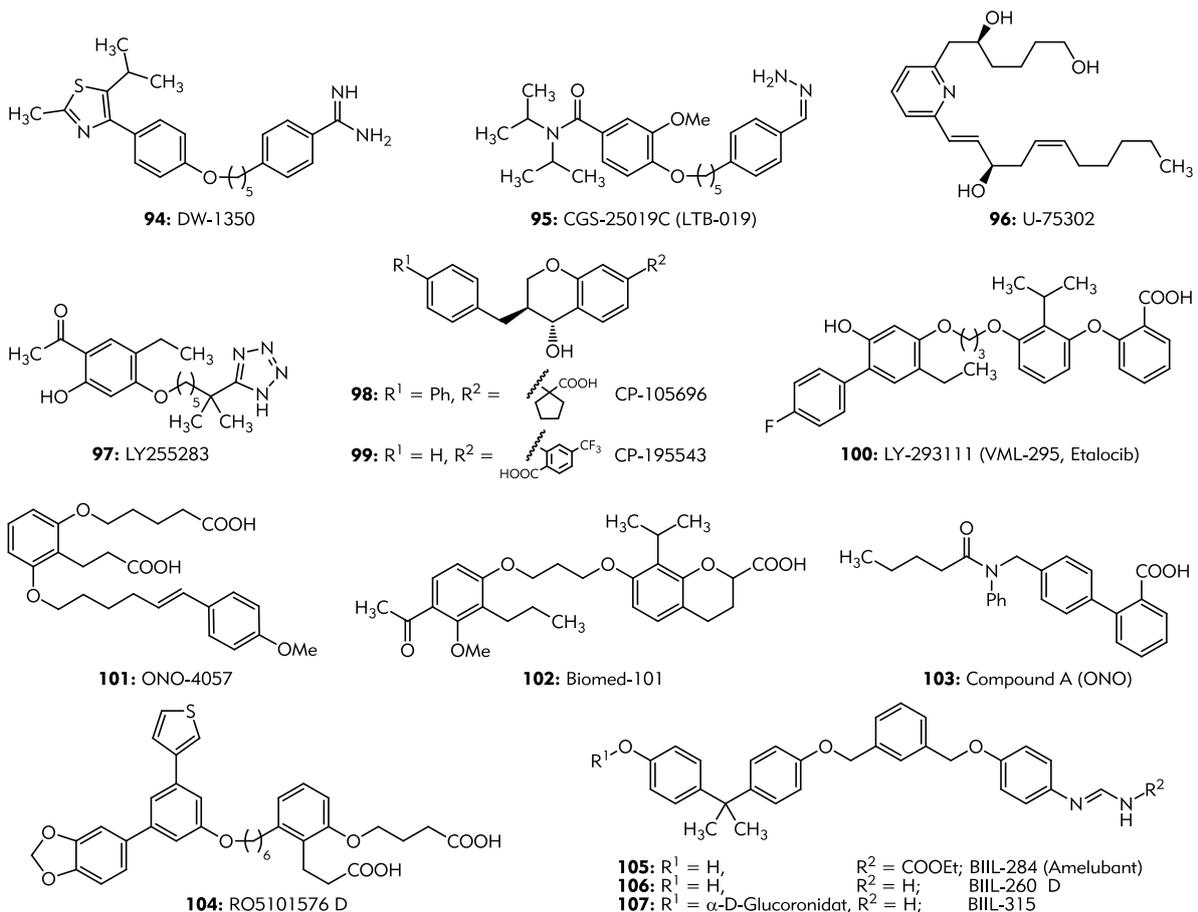


Abbildung 35: BLT-Rezeptor-Antagonisten

DW-1350 (**94**) wurde zur Behandlung von Osteoporose entwickelt und inhibiert die Osteoklastenproliferation mit einem IC₅₀-Wert von 20 nM. An welchen der beiden Subrezeptoren es bindet, ist nicht bekannt. Verbindung **95** (CGS-25019C), bei der ebenfalls nicht bekannt ist, an welchen Subrezeptor sie bindet, zeigte in einer klinischen Studie zur Behandlung von COPD

Montelukast (**108**), der als Einziger keinerlei Wechselwirkung mit dem cys-LT₂-Rezeptor eingeht und nicht die Bindung von LTC₄, Serotonin, Acetylcholin, Histamin und PGD₂ antagonisiert, wird als *first-line* Therapeutikum und als ergänzende Therapie zu inhalativen Kortikosteroiden bei leichtem bis mittelschwerem Asthma und allergischer Rhinitis angewendet. Montelukast (**108**) weist einen IC₅₀-Wert von 4.9 nM auf und wird vor allem bei Kindern eingesetzt, da es aufgrund seiner oralen Verfügbarkeit nicht mit einem Inhalator appliziert werden muss, was die Therapie-treue erhöht. Zafirlukast (**109**) ist mit **108** vergleichbar, weist jedoch eine schwache Aktivität an cys-LT₂-Rezeptor auf. Das Tetrazolderivat Pranlukast (**111**) ist ebenfalls am cys-LT₂-Rezeptor aktiv (IC₅₀ (cys-LT₁) = 4-7 nM, IC₅₀ (cys-LT₂) = 3.6 μM) und zeigt ein therapeutisches Potenzial zur Behandlung ischämischen Schlaganfall. Das LTD₄/LTE₄-Strukturanalogon Pobilukast (**110**) bindet mit einem IC₅₀-Wert von 30 nM an den cys-LT₁-Rezeptor ohne Histamin, PGD₂ oder Platelet Aktivierungsfaktoren (PAF) zu beeinflussen. Der Zafirlukast-Abkömmling ICI-198615 (**112**) als auch das Tyrosinderivat **116** (CR3465) sind cys-LT₁-Rezeptor-Antagonisten, die anti-entzündliche Aktivität aufweisen und sowohl in der Behandlung von rheumatoider Arthritis als auch in Krebsmodellen untersucht wurden.^[214,215] BAY-u9773 (**114**) das ein LTE₄-Analogon ist, weist antagonistische Aktivitäten an beiden Subzeptoren auf (IC₅₀ (cys-LT₁) = 247 nM, IC₅₀ (cys-LT₂) = 4.6 μM)^[216]. Das Bicyclo[4.1.0]derivat **115** (BAYCysLT2) ist ein selektiver cys-LT₂-Antagonisten, der bei myokardialer Ischemie und Reperfusionverletzungen in Mausmodell gute Ergebnisse erzielte.^[216] Der cys-LT₁ selektive Antagonist MK-571, **113**, inhibiert die Bindung von LTD₄ an cys-LT₁, ohne die Bindung von LTC₄ zu beeinflussen, obwohl MK-571 ein MRP1 (LTC₄-Transporter) Inhibitor darstellt.^[20,201]

2.4.6.2 Inhibition der 5-LO

Die Inhibition der 5-LO stellt den vielversprechendsten Ansatz in der anti-LT-Therapie dar (vgl. 2.4.6 *Anti-LT-Wirkstoffe*). Neben der direkten Inhibition der 5-LO kann auch das 5-LO aktivierenden Protein (FLAP) inhibiert werden. Da FLAP für die *In vivo*-Aktivität der 5-LO unabdingbar ist, führt eine FLAP-Inhibition indirekt zu einer 5-LO-Inhibition.^[20,201]

2.4.6.2.1 FLAP-Inhibitoren

MK886 (**91**) die Muttersubstanz aller FLAP-Inhibitoren (Abbildung 37) und hat maßgeblich zum Verständnis von FLAP beigetragen. Verbindung **91** weist einen IC₅₀-Wert von 30 nM für FLAP und inhibiert die LT-Biosynthese mit einem IC₅₀-Wert von 3 nM.^[217]

MK0591 (**116**), das eine Weiterentwicklung der MK886 Grundstruktur darstellt, hat bereits eine Phase-II-Studien erfolgreich absolviert.^[218,219] Mit Hilfe von MK0591 wurde auch die Kristallstruktur von FLAP gelöst.^[195] Das verwandte Indolmethoxy-pyridinderivat **118** weist einen IC₅₀ von <10 μM auf und zeigt, dass die Indolsubstitution nicht essentiell ist. L-689065 (**117**) zeigt einen weiteren verwandten Prototyp der FLAP-Inhibitoren, in denen der Schwefel in einer verbrückten Thiopyranstruktur eingebunden ist. Verbindung **117** weist als Racemat einen IC₅₀-Wert von 22 μM auf.^[220]

Die Amira Pharmaceuticals Serie **119**^[221]-**120** gehört zur zweiten Generation an FLAP-Inhibitoren, die zur Behandlung von Asthma und kardiovaskulären Erkrankungen entwickelt wurde. Substanz **121** stellt die Optimierung von AM-803 (**120**) nach erfolgreicher Phase-II-Studien zu Behandlung von Asthma dar.^[20,222,223] Die von Boehringer Ingelheim stammende Verbindung **122** ist ebenfalls ein potenten, schwefelfreier FLAP-Inhibitor der zweiten Generation (IC₅₀ = 44 nM), ebenso wie eine Benzoimidazopyrimidinaminserie (repräsentiert durch **123** und **124**), die IC₅₀-Werte um ca. 1.4 μM aufweisen. Das Oxadiazol **125** steht exemplarisch für diese weitere, neue Gruppe an FLAP-Inhibitoren (IC₅₀ = 3.2 nM, Vollblut-Assay IC₅₀ = 24 nM).^[222]

2.4.6.2.2 Direkte 5-LO-Inhibitoren

Ein mit den bisher gezeigten Inhibitoren nicht verwandter Inhibitor ist Veliflapon (**126**, BAY-X1005), der einen IC_{50} -Wert von ca. 60 nM^[224] aufweist. Veliflapon konnte bei der Behandlung von Asthma keine signifikante Besserung erzielen, hat jedoch erfolgreich eine klinische Phase-II-Studie zu myokardialem Infarkt abgeschlossen und wird nun in Phase III getestet.^[199,222,223]

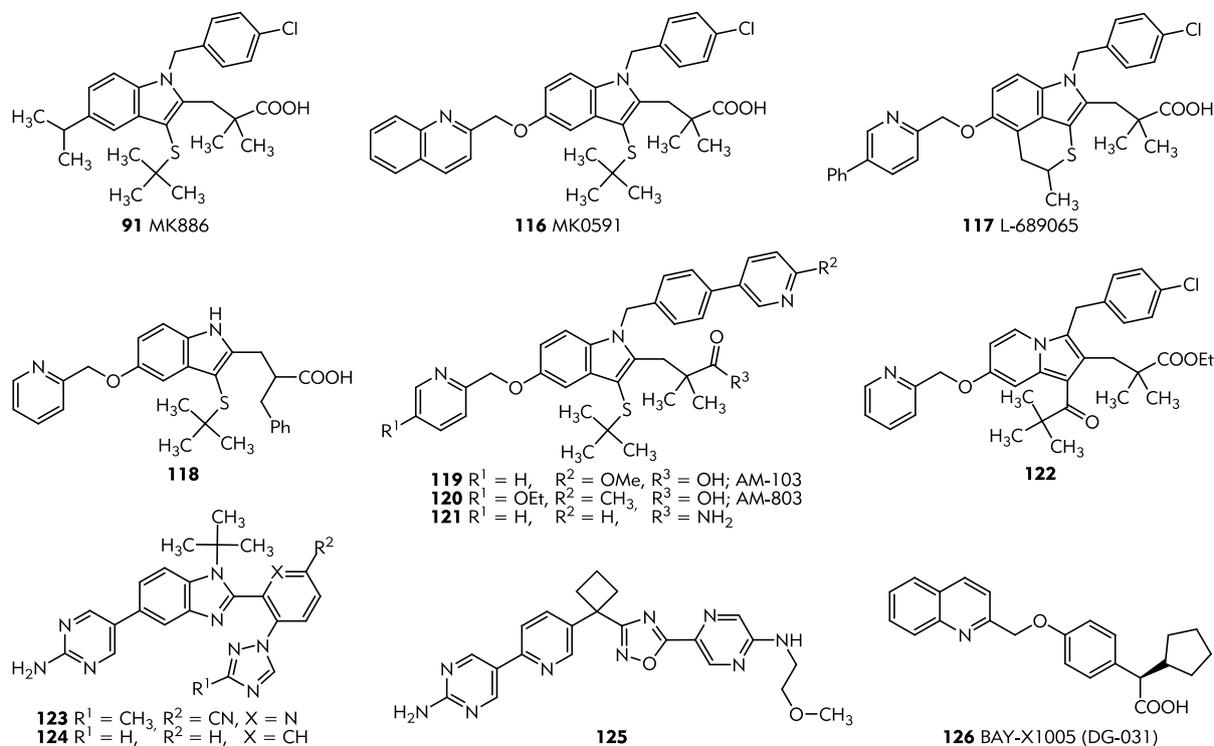


Abbildung 37: FLAP-Inhibitoren

2.4.6.2.2 Direkte 5-LO-Inhibitoren

Da die 5-LO das Schlüsselenzym der LT-Synthese darstellt, wird den 5-LO-Inhibitoren bei der Behandlung von Asthma, allergischer Rhinitis, Arteriosklerose und Krebs ein großes therapeutisches Potential zugeschrieben. Neuere Indikationsfelder sind Malaria, chemische Krebsvorsorge und chronische, myeloide Leukämie (CML).^[225] Aufgrund ihres Wirkmechanismus lassen sich die Inhibitoren der 5-LO in drei Gruppen einteilen: redox-aktive, Eisen-Liganden und non-redox Inhibitoren.

Redox-aktive Inhibitoren

Diese frühe Gruppe an 5-LO-Inhibitoren sind redox-aktive Moleküle, wie zum Beispiel Chinone, die in den Katalysezyklus eingreifen, das aktive Eisen-III in die inaktive Form (Fe^{2+}) reduzieren und dabei selbst oxidiert werden.^[192]

Das redox-aktive Phenothiazinon **128**, welches eine Weiterentwicklung des Chloroderivats **127** ist, weist im Gegensatz zu ihm keine Toxizität (u. a. Methämoglobinbildung) mehr auf (Abbildung 38). Der IC_{50} -Wert liegt zwischen 0.3 und 0.4 μM .^[226] Die Verbindung wurde aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht weiterentwickelt. Unter den Chinonderivaten ist AA-861 (**129**) das meist erforschte. Es wurde in einer klinischen Phase-II-Studie zu Allergien und Asthma untersucht, die jedoch nicht fortgeführt wurden und hat eine Phase-III-Studie zu rheumatoider Arthritis absolviert. AA-861 weist neben einer guten 5-LO-Hemmung ($IC_{50} = 0.8 \mu M$) auch Aktivität an epidermaler 12-LO auf ($IC_{50} = 1.9 \mu M$).^[227] Da von einigen phenolischen Naturstoffen, wie **130-132**, bekannt ist, dass sie die 5-LO inhibieren, wurden sie zu Leitstrukturen.

L-656224 (**133**) und L-670630 (**134**) sind beides oral verfügbare, selektive 5-LO-Inhibitoren (beide $IC_{50} = 0.4 \mu M$)^[228], die ebenfalls wegen Methämoglobinbildung nicht weiter verfolgt wurden. Weitere 5-LO aktive Phenolderivate sind R68151 (**135**), das eine klinische Studien zur topischen Anwendung bei Hauterkrankungen^[229] durchlaufen hat, und TMK-688 (**136**), das zur Behandlung vom schwere Asthma klinisch untersucht wurde.^[230] DUP654 (**137**), das ebenfalls klinische Studien durchlaufen hat, weist neben der 5-LO-Aktivität auch antagonistische Effekte an 12-HETE-Rezeptoren auf.^[231] Eine weitere Klasse an redox-aktiven 5-LO-Inhibitoren sind die heterozyklischen Hydrazide **138-140**. Sie sind im mikromolaren Konzentrationsbereich aktive 5-LO-Inhibitoren (BW755C: $IC_{50} = 4.9 \mu M$, ICI207968: $IC_{50} = 1.0 \mu M$, A-53612: $IC_{50} = 1.0 \mu M$)^[232,233], die jedoch auch zur Methämoglobinbildung neigen^[232] und deshalb nicht weiterentwickelt wurden.^[192]

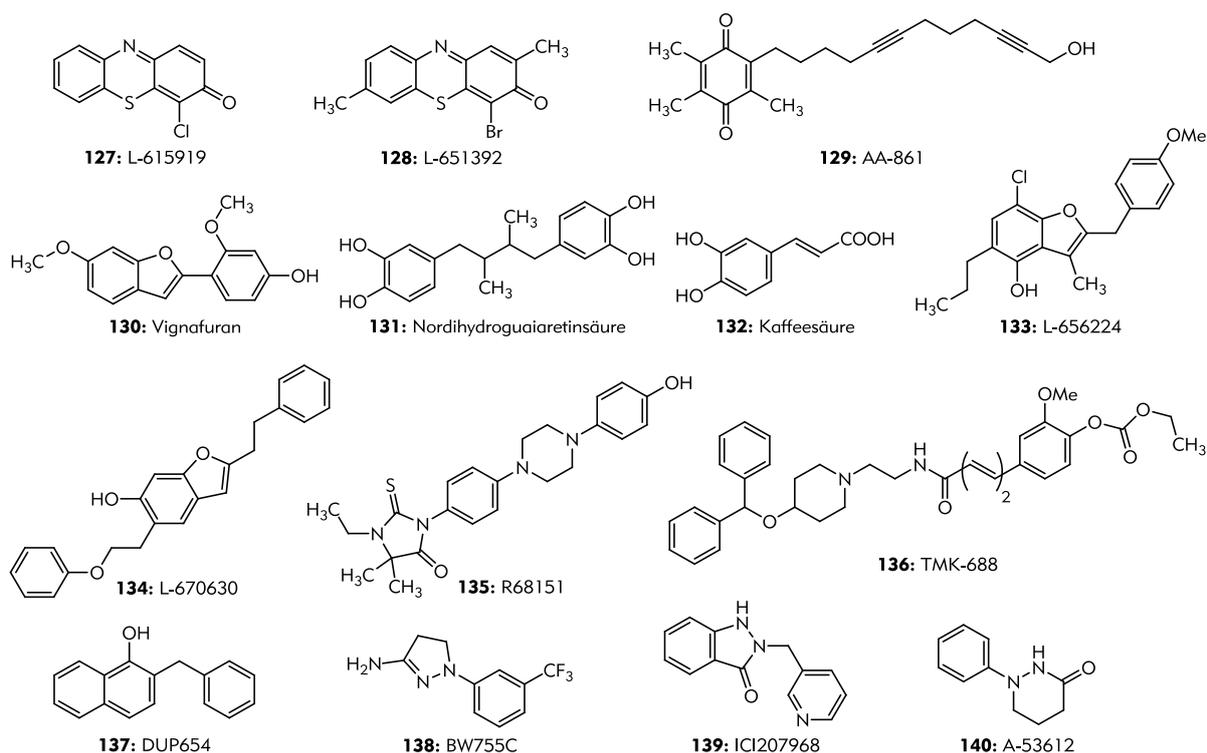


Abbildung 38: redox-aktive 5-LO-Inhibitoren

Aufgrund vieler Nebenwirkungen und den Wechselwirkungen mit jeglichen eisenhaltigen Enzyme (Methämoglobinbildung) wurden die redox-aktiven 5-LO-Liganden nicht mehr weiter aktiv beforscht.^[192]

Eisen-Liganden

Hydroxamsäuren im Allgemeinen und Hydroxamsäurederivate stellen hoch potente 5-LO-Inhibitoren dar, da sie das katalytisch aktive Eisen-II-Ion komplexieren und somit die 5-LO-Aktivität inhibieren.

Die *N*-Acetylhydroxamsäurederivate BW-A4C (**141**) und A-63162 (**142**) (Abbildung 39) sind selektive 5-LO-Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert von 40 nM bzw. $0.59 \mu M$.^[197,234] Die Acetylderivate werden im Organismus schnell abgebaut und zu Nitroxidradikalen oxidiert, weshalb die stabileren *N*-Hydroxyhamstoffen entwickelt wurden.^[192] Zileuton (**143**) ist ein prominenter Vertreter dieser Klasse und ist der einzige zugelassene 5-LO-Inhibitor, jedoch nicht in Deutschland. Er ist weniger potent als die Acetylderivate ($IC_{50} = 0.4\text{--}0.5 \mu M$, IC_{50} (HWB) = $0.9 \mu M$) aber hydroly-

sestabil, oral verfügbar und wird zur Behandlung von mittelschwerem Asthma eingesetzt, wobei auch bei allergischer Rhinitis, rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen therapeutische Nutzen festgestellt wurde.^[197,222] Zileuton (**143**) besitzt jedoch eine schlechte Pharmakokinetik und muss deshalb oft und in hohen Dosen eingenommen werden und ist lebertoxisch.^[197,223,227] Die Suche nach weiteren eisenchelatisierenden 5-LO-Inhibitoren brachte die zweite Generation an Hydroxamsäurederivaten (**144-146**) hervor. A79175 (**144**) ist potenter als Zileuton ($IC_{50} = 25 \text{ nM}$)^[235] und weist aufgrund einer größeren Resistenz gegenüber Glucuronierung eine deutlich höhere Halbwertszeit auf. Ebenso verhält sich das strukturell verwandte Arteleuton (**145**) und auch LDP-977 (**146**) (Vollblut-Assay $IC_{50} = 120 \text{ nM}$). Arteleuton besitzt eine Halbwertszeit von 16 Stunden, weist auch im Vollblut-Assay einen sehr guten IC_{50} -Wert von 150 nM ($IC_{50} \text{ (PMNL)} = 22 \text{ nM}$) auf und hat eine klinische Phase-III-Studie zur Behandlung von Asthma absolviert.^[197,227] Verbindung **147** ist eines der neuesten, oral verfügbaren Hydroxamsäurederivaten, das zu Behandlung und zur Krebsvorsorge entwickelt wurde.^[222]

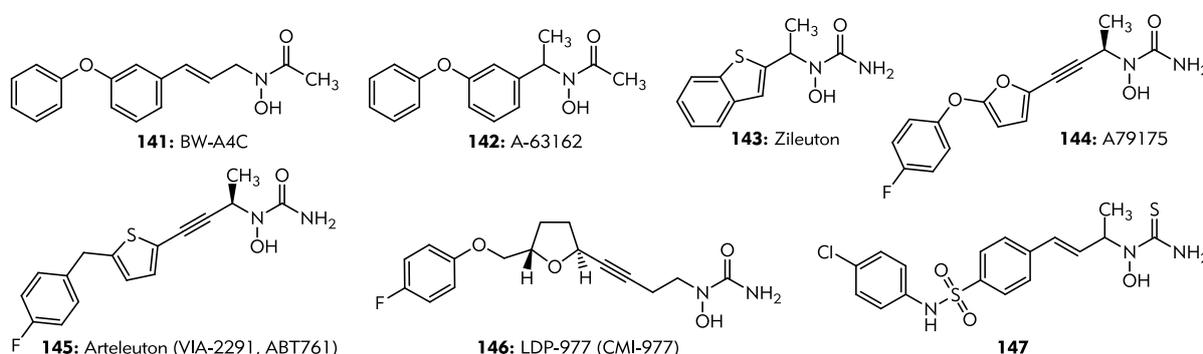


Abbildung 39: Eisenchelatisierende 5-LO-Inhibitoren

Nicht-redox-aktive Inhibitoren

Da sowohl redox-aktive als auch eisenchelatisierende 5-LO-Inhibitoren gewisse Nachteile, wie fehlende Selektivität und dadurch gesteigerte Nebenwirkungsraten mit sich bringen, wurden nicht-redox-aktive Inhibitoren entwickelt. Die meisten dieser Verbindungen, die strukturell sehr unterschiedlich sind, sind kompetitive, orthosterische Inhibitoren, wobei auch allosterische Bindungsstellen an der 5-LO existieren (vgl. 2.4.4 Stimulation und Regulation der 5-LO). Viele der nicht-redox-aktiven Inhibitoren weisen eine stimulusabhängige Inhibition auf, weshalb die Entwicklung neuer, stimulusunabhängiger Inhibitoren stetig voranschreitet.^[192,222,223,225]

Einer der ersten direkten, oral verfügbaren 5-LO-Inhibitoren aus der Reihe der Methoxyalkylthiazole^[236] ist ICI-211965 (**157**) mit einem IC_{50} -Wert von $0.4 \mu\text{M}$ ^[237] (Vollblut-Assay).^[192] Zeitgleich wurde auch eine Reihe von Methoxytetrahydropyranen, wie ZM-230487 (**158**, stimulusabhängig: $IC_{50}(\text{Ca}^{2+}) = 0.2 \mu\text{M}$ und $IC_{50}(\text{Phosphorylierung}) = 8.0 \mu\text{M}$)^[238] evaluiert (Abbildung 40). ZD-2138 (**159**) ging aus der Optimierung dieser Serien hervor. ZD-2138, der eine höhere Bioverfügbarkeit als die ersten Derivate besitzt, inhibiert die LTD_4 - und LTB_4 -Produktion mit IC_{50} -Werten von $0.3 \mu\text{M}$ bzw. $0.4 \mu\text{M}$.^[192,239] Nach einer Phase-II-Studie zu Asthma wurde die Entwicklung nicht weitergeführt.^[227] Eine Kombination aus Methoxytetrahydropyran und dem Naturstoff Justicidin E (9-(1,3-Benzodioxol-5-yl)furo[3',4':6,7]naphtho[2,3-d][1,3]dioxol-6(8H)-one), der selbst ein 5-LO-Inhibitor ist, stellt L-697198 (**160**, $IC_{50} = 1.5 \text{ nM}$)^[197] dar.^[192] Mit der neuesten Weiterentwicklung dieser Substanzklasse ist **161** (PF-4191834). PF-4191834 ist ein selektiver, potenter, nicht-redox-aktiver 5-LO-Inhibitor ($IC_{50} = 229 \text{ nM}$), der im Tierversuch sehr gute Ergebnisse bei Entzündungen und Schmerz erzielte.^[240] Die Methoxytetrahydropyranerivate wurden zu 3,8-Dioxabicyclo[3.2.1]nonylderivaten wie **162** und **163** weiterentwickelt.^[241]

L-739-010 (**162**) weist dabei eine stimulusabhängigen (Ca^{2+} oder Phosphorylierung) IC_{50} -Wert von 1.6 nM bzw. 42 nM im Vollblut-Assay auf.^[197] Setileuton oder MK0633 (**164**) ist ein neuer klinischer Kandidat zur Behandlung von Atemwegserkrankungen. Das (*S*)-Enantiomer weist dabei einen ca. 60-fach niedrigeren IC_{50} -Wert (3.9 nM) auf als das (*R*)-Enantiomer (230 nM).^[242] Die Indolizine **165** und das Benzothiophen **166** sind Vertreter einer jeweiligen Serien aus dem Jahr 2011 und besitzen auch die Oxadiazol-trifluorbutan Struktur. Die IC_{50} -Werte liegen jeweils unter $0.3 \mu\text{M}$. Der Naturstoff Curcumin (**167**), der 5-LO und COX-Aktivität aufweist, diene ebenfalls als Leitstruktur für zahlreiche 5-LO-Inhibitoren.^[222]

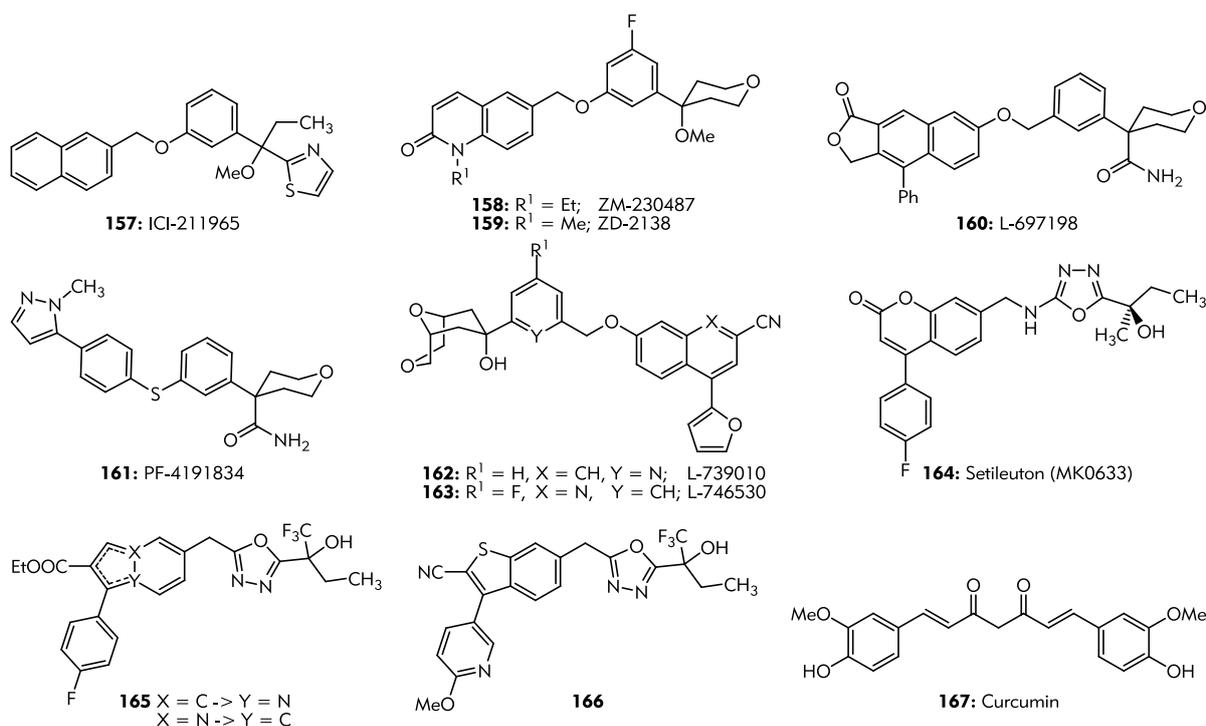


Abbildung 40: Direkte, nicht-redox-aktive 5-LO-Inhibitoren

In jüngster Zeit wurden vermehrt computerbasierte Methoden und virtuelle Screeningmethoden eingesetzt, um neue 5-LO-Inhibitoren bzw. Struktur motive zu finden. Einige dieser Erfolge (**168-175**) sind in Abbildung 41 mit IC_{50} -Werten gezeigt.^[222]

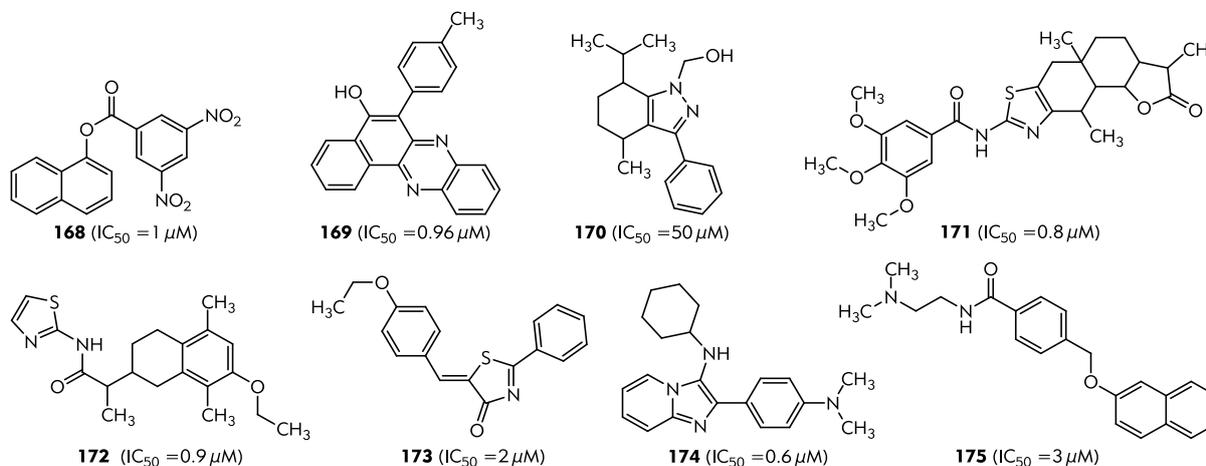


Abbildung 41: nicht-redox-aktive 5-LO-Inhibitoren aus computerbasierten Screeningmethoden

Duale 5-LO-/COX-Inhibitoren

Durch Inhibition des 5-LO-Weges wird die Konzentration an Arachidonsäure erhöht, was zu einer erhöhten Produktion an pro-inflammatorischen Prostaglandinen über den Cyclooxygenase (COX)-Weg führen kann. Um diesen Shift zu unterdrücken sind duale 5-LO/COX-Inhibitoren entwickelt worden, die als analgetisch, anti-inflammatorisch und antiasthmatisch beschrieben werden. Zudem wird ihnen eine antikanzinogene Wirkung zugeschrieben, wie es bei Celecoxib (**176**) der Fall ist.^[222,243]

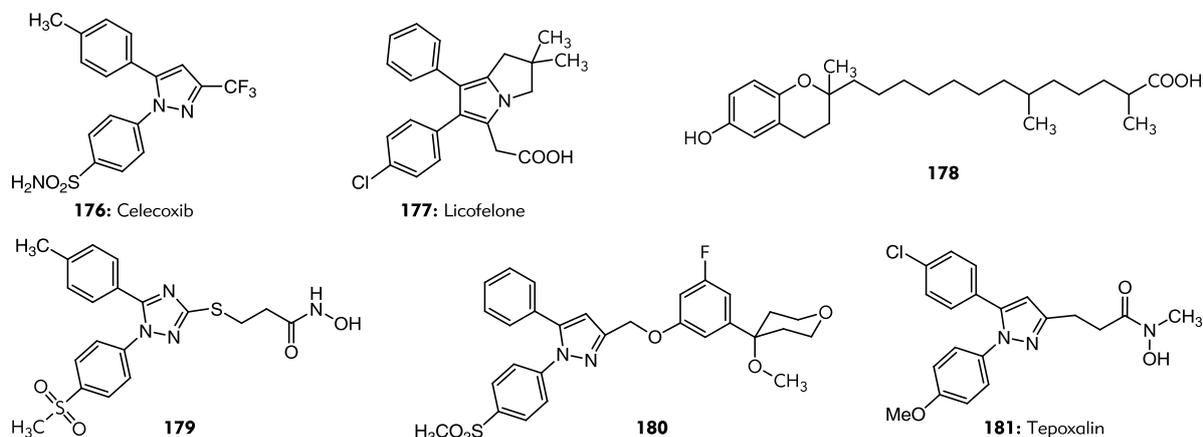


Abbildung 42: Duale 5-LO-/COX-Inhibitoren

Celecoxib (**176**) ist ein nichtsteroidaler, anti-inflammatorischer COX-2 selektiver Inhibitor, der zur Behandlung von chronischer Polyarthritits eingesetzt wird. Celecoxib weist einen IC_{50} -Wert von $25 \mu M$ für 5-LO auf.^[244] Licofelone (**177**) ist einer der vielversprechendsten dualen Inhibitoren, der bereits eine Phase-III-Studie zu Knieosteoarthritis absolviert hat, wobei Licofelone neben COX-1 und 2 nicht direkt die 5-LO inhibiert, sondern FLAP (IC_{50} der 5-LO-Produkte $0.21-3.8 \mu M$)^[245].^[222,227] Im Gegensatz zu den meisten dualen Inhibitoren weist **178** nicht das bei vielen COX-Inhibitor vorhandene Diaryl-Heterozyklus-Motiv auf. Pharmakologische Daten sind für **178** nicht publiziert.^[222] Die Substanzen **179-181** sind Hybridverbindungen, die Pharmakophore von bekannten Inhibitoren beinhalten. Verbindung **179** leitet sich direkt von Celecoxib (**176**) ab und weist aufgrund der für eisenchelatisierenden 5-LO-Inhibitoren typischen Hydroxamsäurestruktur inhibitorische Aktivität an COX und 5-LO ($IC_{50} = 0.45-1.07 \mu M$) auf.^[222] Verbindung **180** kombiniert eine Celecoxib-Grundstruktur mit dem Methoxytetrahydropyran-5-LO-Fragment und besitzt einen IC_{50} -Wert von $5 nM$ für 5-LO in Granulocten-ähnlichen Zellen.^[188] Tepoxalin (**181**) ist ein in der Tiermedizin (Hund) zugelassener dualer Inhibitoren, der bei akuter und chronischer muskuloskeletalen Erkrankungen wie Arthritis zur Eindämmung der Entzündung und als Schmerzmittel eingesetzt wird. Tepoxalin wird als Leitstruktur zur Entwicklung weiterer dualer Inhibitoren verwendet.^[222]

2.4.6.2.3 Thiazolon-basierte 5-LO-Inhibitoren

Durch ein ligandenbasiertes, virtuelles (*in silico*) Screening bei dem durch verschiedene Methoden die dreidimensionale Verteilung der partiellen Atomladungen von bekannten 5-LO-Inhibitoren verglichen wurde, und ein nachgeschaltetes Medium-Throughput Screening haben Hofmann *et al.*^[243] **173** und damit die Aryliden-Aryl-Thiazolone^[225] als potente, direkte 5-LO-Inhibitoren identifiziert (Abbildung 41). Verbindung **173** und die Weiterentwicklung **C06** (**182**) stellen eine neuartige Klasse an 5-LO-Inhibitoren dar. Bis dato waren nur die Benzylideniminothiazolidinon (wie **183**) von Unangst *et al.*^[246] und Benzyliden(thiazol-2-ylimino)thiazolidinone (wie **184**)^[247] als duale 5-LO/COX-Inhibitoren bzw. 5-LO-Inhibitoren bekannt (Abbildung 43).^[243]

2.4.6.2.3 Thiazolon-basierte 5-LO-Inhibitoren

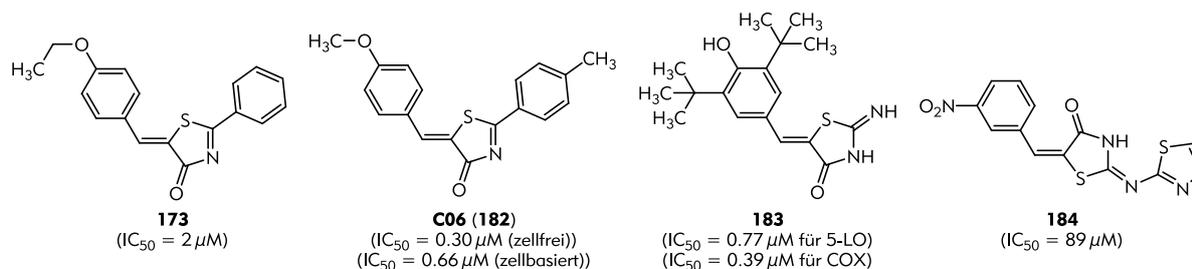


Abbildung 43: Thiazolon-basierte 5-LO-Inhibitoren

2.4.6.2.4 Charakterisierung von C06 und bisheriger Derivate

Die Klasse der neuartigen Aryliden-Aryl-Thiazolon 5-LO-Inhibitoren mit **C06** als einer der prominentesten Vertreter, ist eingehend untersucht worden. **C06** ist sowohl in zellbasierten (PMNL = Polymorphonukleare Leukozyten) als auch unter zellfreien Bedingungen (S100 = 100000 × g Überstand von PMNL Homogenaten) aktiv (vgl. Abbildung 43). Im Gegensatz zu vielen nicht-redox-aktiven 5-LO-Inhibitoren (vgl. z.B. ZM-230487 (**158**) Seite 54) zeigt **C06** keine Abhängigkeit des Inhibitionspotentials vom Redox-Milieu bzw. des Aktivierungswegs der 5-LO (Ca²⁺ vs. Phosphorylierung). Der IC₅₀-Wert ist sowohl in intakten PMNL-Zellen, in denen die Lipidhydroperoxidkonzentration hoch ist, als auch in den Homogenaten von PMNL-Zellen miteinander vergleichbar. Da chronische Entzündungen lokal immer hohe Peroxidkonzentrationen aufweisen, ist eine Unabhängigkeit des Inhibitionspotentials vom Redox-Milieu essentiell für die klinische Verwendung von 5-LO-Inhibitoren. Für die Ca²⁺-induzierte Aktivierung der 5-LO liegt der IC₅₀-Wert von **C06** bei 0.7 μM und bei Aktivierung durch Phosphorylierung bei 0.2 μM. **C06** ist ein selektiver 5-LO-Inhibitor, der keinerlei Aktivität an den anderen LOs (12-LO, 15-LOs), cPLA₂, PPARs, COX-2 oder FLAP aufweist.^[225] Der Bindungsmodus von **C06** unterscheidet sich grundlegend von dem anderer Inhibitoren, da **C06** vermutlich weder im aktiven Zentrum noch an der C2-Domäne bindet. Durch Versuche mit hohen Konzentrationen an Arachidonsäure konnte eine kompetitive Bindung ausgeschlossen werden, da der IC₅₀ nicht wie für kompetitive Inhibitoren typisch anstieg. Ebenso wurde die Bindung von **C06** nicht durch Phosphatidylcholin oder andere C2-Domänenbinder verändert. Es wird daher angenommen, dass **C06** allosterisch an die 5-LO bindet, wobei auch die regulatorische Bindungsstelle in der C2-Domäne ausgeschlossen werden konnte. Eine von Hoffman *in silico* modellierte, großflächige Bindetasche, konnte durch Mutationsexperimente bisher nicht bestätigt werden.^[248] **C06** ist ein potenter, nicht kompetitiver, nicht, allosterisch bindender, selektiver 5-LO-Inhibitor mit einem neuartigen Wirkmechanismus.^[225]

Im Tierversuch konnte sich **C06** nicht profilieren, da aufgrund der schlechten Löslichkeit (vgl. Abbildung 44) und hohen Lipophilie keine ausreichend hohen Plasma- und Gewebekonzentrationen erzielt werden konnten.^[225]

Aufgrund des Potentials von **C06** ((Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolythiazol-4(5H)-on, **182**) und der Aryliden-Aryl-Thiazolone wurden sie von den Arbeitsgruppen Stark und Steinhilber intensiv beforscht.^[225,249] In einer erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Studie^[225] (SAR-Studie) wurde der Einfluss verschiedener Substituenten an den Phenylringen und die Rolle des 2-Phenylrings evaluiert. Dabei zeigte sich, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Substituenten toleriert wird. Sogar Verbindungen mit voluminösen Substituenten wie *tert*-Butylphenyl oder Anthracen wiesen eine mikromolare 5-LO-Inhibition auf. Wird jedoch der 2-Phenylring durch aliphatische, zyklische Amine wie Pyrrolidin, Piperidin, Azepan oder stickstoffverknüpfte Arylsubstituenten ersetzt, führt dies zu einem Verlust der Aktivität.^[225]

Die Studie zeigte, dass Substitutionen am Aryliden-Aryl-Grundgerüst die Aktivität nur gering beeinflussen, der 2-Phenylring wichtig für die Aktivität ist und dass die Aryliden-Aryl-Thiazolone eine flache, sogenannte kontinuierliche SAR^[250] aufweisen. Wawer *et al.*^[251] konnten zeigen, dass eine kontinuierliche SAR, also eine große Toleranz gegenüber strukturellen Variationen bei gleichbleibender Aktivität, typisch für LO-Inhibitoren ist.^[225]

In einer zweiten Studie^[249] wurden die SAR vertieft. Dabei wurden die elektronischen Eigenschaften und die Lipophilie der Phenylsubstituenten verändert, der Einfluss der jeweiligen 4- und 4'-Reste an den Phenylringen untersucht und bitycliche und biphenyl Reste eingeführt. Die Vergrößerung des aromatischen Systems durch Einführung von Naphthyl- bzw. Phenoxyphenylsubstituenten wurde von der 5-LO ebenso gut toleriert wie der Austausch der 4- und 4'-Reste bzw. die Substitution mit verschiedenen Halogenen an dem 2-Phenylsystem, wobei die verschiedenen Substanzen unterschiedlichste Pharmakokinetiken aufwiesen. Geringfügige Änderungen des Substitutionsmusters führten beispielsweise zu einem Aktivitätsverlust in zellbasierten oder zellfreien Assay. Weiterhin zeigte sich, dass in einigen Fällen das Vertauschen der 2- und 5-Substituenten am Thiazolon die Aktivität drastisch erniedrigt und in anderen Fällen keinerlei Einfluss hat – zum Beispiel weist das entsprechende 5-Naphthyl-2-Methoxybenzylidenderivat von **186** (Abbildung 44) einen 75 mal bzw. 30 mal höheren IC₅₀-Wert auf als **186**.^[249]

Die flache SAR hat sich auch in dieser Studie bestätigt. Wie von Ford-Hutchinson *et al.*^[192] 1994 bereits gezeigt wurde, wurde zu dem bestätigt, dass eine hohe Lipophilie eine Charakteristikum von vielen potenten 5-LO-Inhibitoren ist.^[249]

Die Entwicklung der Aryliden-Aryl-Thiazolone und der vielversprechendsten Derivate aus beiden Studien sind in Abbildung 44 dargestellt, wobei auch sie eine geringe Löslichkeit aufweisen.

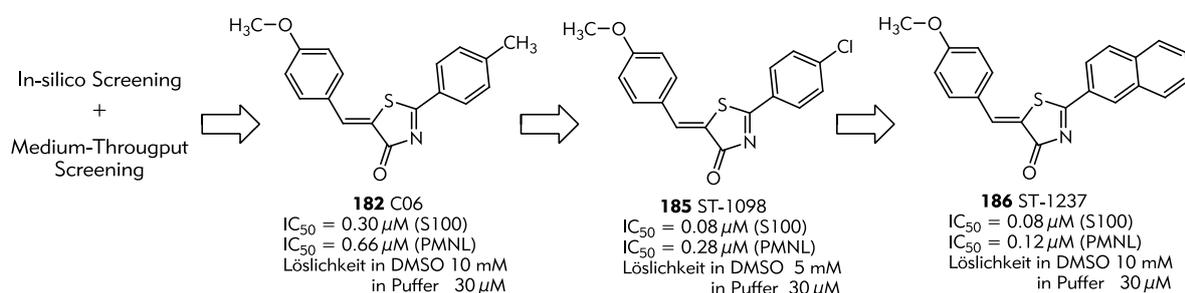


Abbildung 44: Entwicklung der Aryliden-Aryl-Thiazolone

3. Zielsetzung & Motivation

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von Liganden für den Lipidstoffwechsel im Bereich der Leukotriene und der Sphingolipide. Beide sind in vielen Krankheitsbildern gestört und nehmen Einfluss auf die Entstehung und das Voranschreiten verschiedener Erkrankung. Das Lipidsignalling der Sphingolipide und der Leukotriene kann durch Fehlregulation der Zellfunktionen unter anderem chronische Entzündungen, Autoimmunreaktionen und Allergien auslösen. Des Weiteren trägt es zu kardiovaskulären, degenerativen und metabolischen Erkrankungen bei und spielt beim Tumorwachstum eine Rolle.

Im Bereich der entzündlichen Erkrankungen besteht über die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) ein direkter Zusammenhang zwischen Sphingolipiden und Leukotrienen. Ceramid-1-Phosphat, Lactosylceramid und Sphingomyelin beeinflussen direkt die Aktivität der cPLA₂, die Arachidonsäure als Ausgangssubstanz aller Leukotriene und Prostaglandine aus der Membran freisetzt.^[10]

Die gezielte Beeinflussung der im Leukotrien- und Sphingolipidstoffwechsel involvierten Enzyme und Rezeptoren stellt dabei einen therapeutischen Angriffspunkt dar, der die Folgen eines gestörten Lipidsignallings adressiert.

3.1 Sphingolipide

Viele der Zusammenhänge im Sphingolipidstoffwechsel, vor allem im Bezug auf die Pathophysiologie, sind bis heute nicht vollständig verstanden bzw. erklärbar. Dazu zählt auch das Zusammenspiel von S1P auf seine Rezeptoren und ihre Funktionen an den einzelnen Lokalisationen. Dieser Bereich bietet ein großes Potential für die Entwicklung neuer Medikamente, da die Sphingolipide an vielen essentiellen Prozessen im Körper beteiligt sind (vgl. S. 20). Umso wichtiger ist das Verständnis des Sphingolipidstoffwechsels für die gezielte Entwicklung selektiver Liganden, um dadurch auch die Interaktionen mit sogenannten *off-targets*, die zu unerwünschten Wirkungen führen können, zu minimieren (vgl. S. 23).^[24,153,166]

Wie modulieren Liganden die Funktions- und Wirkungsweise der S1P-Rezeptoren? Was bewirkt die Expression einzelner Rezeptorsubtypen in bestimmten Zellen und warum werden sie dort exprimiert? Selektive pharmakologische Tools können hier einen wichtigen Beitrag leisten um ein tieferes Verständnis über die S1P-Rezeptoren unter physiologischen und vor allem pathophysiologischen Bedingungen zu gewinnen. Die Lokalisierung und Verteilung der S1P-Rezeptoren sowie der jeweilige Bindungsmodus sind wichtig für das Verständnis ihrer Funktionen, Effekte und ihren Interaktionen.^[24,153,166]

Ziel der vorliegend Arbeit war das Design und die Synthese von fluoreszenzmarkierten und zum kovalenten Labeling fähigen, selektiven S1P₁-Liganden (Abbildung 45), die neben der Verwendung zum molekularen Imaging bzw. zur Visualisierung des Rezeptors auch als therapeutische und diagnostische Marker in Affinitäts- und Screeningassays eingesetzt werden können.^[153,166] Dabei wurden substituierte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Strukturen als Leitstruktur gewählt, da sie in vielen S1P₁-selektiven Liganden vertreten ist und eine gute synthetische Zugänglichkeit bieten.

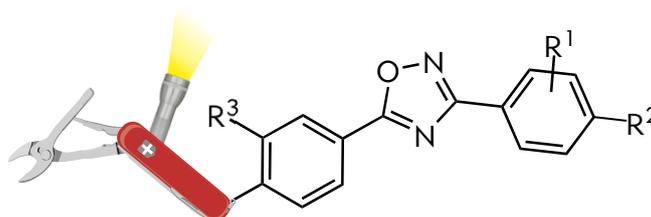


Abbildung 45: Darstellung von pharmakologischen Tools mit Aryl-1,2,4-Oxadiazol-Aryl-Struktur

3.2 5-Lipoxygenase

Die 5-Lipoxygenase ist das Schlüsselenzym in der Synthese der Leukotriene (LT), die eine wichtige Gruppe von Entzündungsmediatoren darstellen. Ihnen wird bei vielen Erkrankungen, wie Asthma, allergischen Reaktionen, (chronischen) Entzündungserkrankungen (z.B. Arteriosklerose), kardiovaskulären Erkrankungen und bei einigen Krebsarten, eine entscheidende Rolle zugeschrieben.^[20,189-192]

Bis dato sind nur zwei Wirkstoffe zugelassen, die in den 5-LO Weg eingreifen: der Cys-LT-Rezeptor-Antagonist Montelukast (**108**, Singulair®) und der eisenchelatisierende 5-LO-Inhibitor Zileuton (**143**, Zylflo®, nur in den USA zugelassen). Daher besteht ein großer Bedarf an neuen, selektiven 5-LO-Inhibitoren, die zu Arzneistoffen zur Behandlung von LT-assoziierten Krankheiten weiterentwickelt werden können. Zudem scheitern viele klinische Kandidaten aufgrund von unerwünschten Wirkungen oder weisen unvorteilhafte pharmakologische Profile auf (vgl. Zileuton S. 53). Die Aryliden-Aryl-Thiazolone mit **C06** (**182**, (Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on) als gut charakterisiert Leitstruktur stellen eine neuartige Klasse an direkten, selektiven 5-LO-Inhibitoren dar, die das Potential zu neuen anti-Leukotrien-Arzneistoffen aufweisen. Mit dieser Absicht sind sie bereits von Steinhilber und Hofmann zum Patent angemeldet^[252] worden.

Ziel der Arbeit war zum einen die Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen bzw. **C06**-Analoge, die eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Systemen und somit ein verbessertes pharmakologisches Profil aufweisen. Zum anderen sollten verschiedenartige, zum kovalenten und zum Photoaffinity-Labeling fähige **C06**-Derivate synthetisiert werden, da von **C06** und seinen Derivaten lediglich bekannt ist, dass sie allosterisch binden. Versuche, eine *in silico* modellierte Bindetaische durch Mutationsexperimente nachzuweisen, waren bisher nicht erfolgreich.^[248] Desweiteren sollte durch die Synthese von **C06**-Derivaten in denen die einzelnen Elemente des Aryliden-Thiazolgrundgerüsts variiert sind, die kontinuierliche SAR der Aryliden-Aryl-Thiazolone weiter erforscht werden und dadurch eine neue, verwandte Strukturklasse an 5-LO-Inhibitoren erschlossen werden.

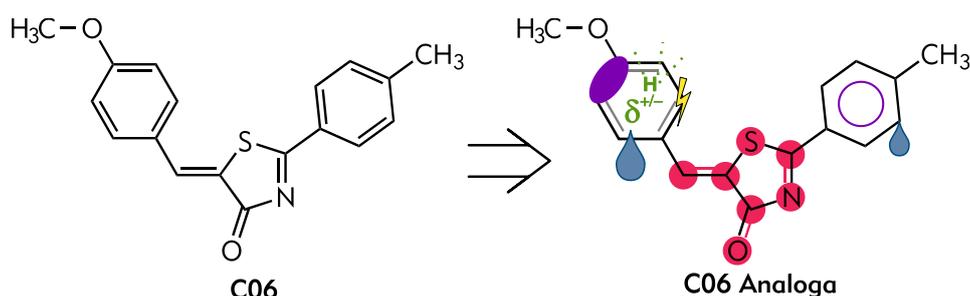


Abbildung 46: Darstellung der synthetischen Veränderungen von **C06**: lila = Heteroaryl; grün = polare Gruppen / Wasserstoffbrücken-Donor/Akzeptor; blau = verbesserte Löslichkeit; gelb = Gruppen zum kovalenten Labeling; rot = Austausch einzelner Elemente/Kernvariationen.

4. Synthetischer Teil

4.1 S1P₁-Liganden

4.1.1 Konzept

In einem Ultrahoch-Throughput Screening am S1P₁- und S1P₃-Rezeptor von Schürer *et al.*^[153] wurde das bereits bekannte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Motiv als privilegierte Struktur für S1P₁-Agonisten, mit guter Selektivität gegenüber S1P₃, identifiziert. Zudem zeigte diese Studie in Analogie zu SEW2871 (**62**) dass für S1P₁-Agonismus keine polare Kopfgruppe nötig ist, sondern, dass der Agonismus auch durch eine Bindung im hydrophoben Teil der Bindetasche erzielt werden kann. Ein Homologiemodell des S1P₁- und S1P₃-Rezeptors zeigt außerdem, dass S1P₁ aufgrund des Leu276, im Vergleich zu Phe263 in S1P₃, eine 50 bis 100 Å³ größere Bindetasche aufweist und somit rigidere und größere Liganden als S1P₃ binden kann. In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass räumlich anspruchsvollere Substituenten am 3'-Arylring, wie 4-Methoxy oder 3,4-Dimethoxy, zu höheren K_i-Werten bzw. einer niedrigeren Affinität führen.^[101,153]

Aus dieser Studie, den dort erlangten Erkenntnissen und den aufgestellten, minimalen strukturellen Anforderungen für S1P₁-Liganden - ein planarer, hydrophober bzw. aromatischer Ring, ein Wasserstoffbrückenakzeptor und ein zweiter aromatischer Ring (vgl. Abbildung 22) - resultiert die der Arbeit zugrunde liegende Leitstruktur (Mitte Abbildung 47).^[101,139,153] Eine Scifinder-Patentrecherche (^[112,123,124,126,130,135,137,138,253-257]) zu S1P₁-Liganden bestätigte die Wahl der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Grundstruktur. Einige dieser in großer Zahl vertretenen 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol sind mit ihren IC₅₀-Werten neben der abgeleiteten Leitstruktur sind in Abbildung 47 gezeigt.

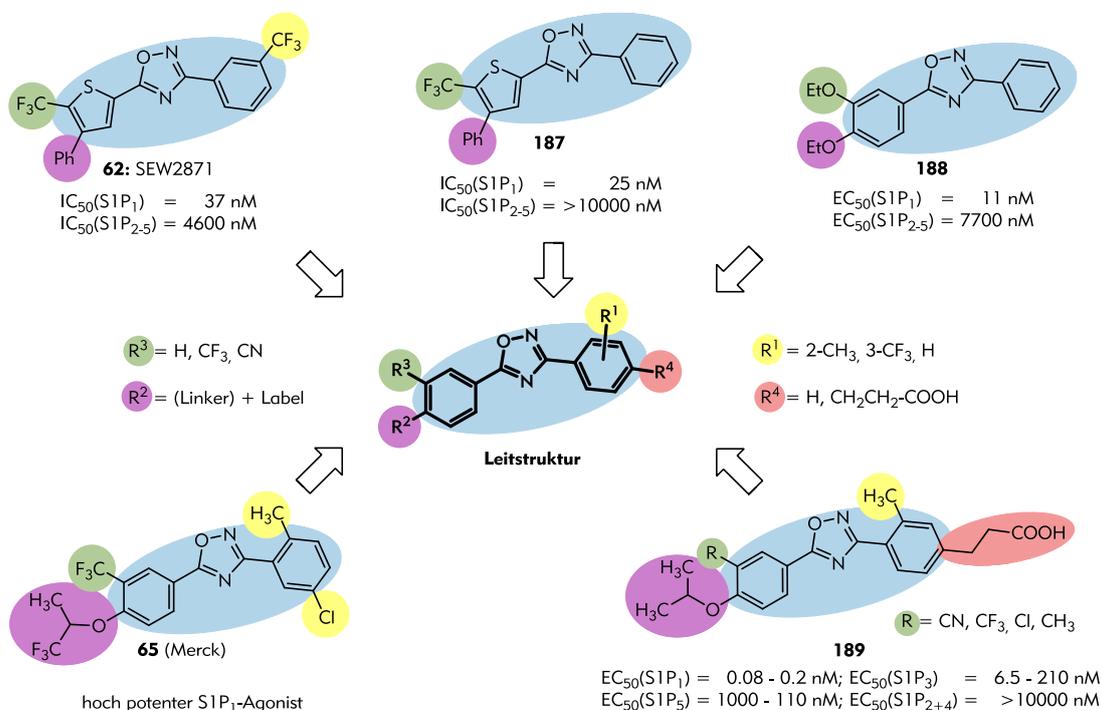


Abbildung 47: S1P₁-selektive Agonisten mit substituierter 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Grundstruktur und daraus entstandene Leitstruktur.^[78,135,153,258-260]

4.1.1 Konzept

Das SEW2871-Analogon **187** und die aus der Arbeit von Schürer *et al.*^[153] stammende Verbindung **188** zeigen, dass ein Substituent am 3'-Arylring (R^1 in Abbildung 47), wie 2-Methyl (**65** und **189**) oder 3'-Trifluormethyl (SEW2871), nicht unbedingt benötigt wird. Ein Vergleich der literaturbekannten 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol basierten SIP_1 -Agonisten^[101] (vgl. S. 27) zeigt, dass größere Substituenten unterschiedlichster Art meist in *para*-Position am 5'-Arylring gebunden sind, und diese oft Etherverknüpft sind (lila in Abbildung 47). Deshalb wurde diese Position für die Einführung des Linkers und der Labels gewählt (R^4 in Abbildung 47). Die Reste R^3 und R^4 wurden erst im späteren Verlauf der Arbeit eingeführt, wobei sich die 5'-Aryl-Propionsäurederivate neben **189** und seinen Derivaten in einer Vielzahl von Liganden^[101] finden (vgl. auch Abbildung 20).

Um die bindenden Wechselwirkungen zwischen der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Struktur und dem Rezeptor nicht durch die Einführung eines Fluorophors zu stören, wurden Ethoxy- bzw. Propoxy-linker in Kombination mit kleinen Fluorophoren verwendet. Als Fluorophore wurde neben 7-(Diethylamino)coumarin^[261,262], 2*H*-Isoindolcarbonitril^[263], und Dansyl (5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid)^[262] hauptsächlich 4-(Dimethylamino)phthalimid (4-DMAP)^[262,264,265] als Fluorophor verwendet (Abbildung 48). Die Verwendung von großen, im roten oder in nahen Infrarot emittierenden Fluorophoren wie z.B. Xanthere oder BODIPY-Derivate direkt am Pharmakophor würde mitunter die Bindung stören, so dass hier deutlich längere Linker hätten verwendet werden müssen. Dansyl-, 4-DMAP-Konjugate und Coumarine haben zudem den Vorteil, dass sie in Abhängigkeit von ihrer unmittelbaren Umgebung ihre spektroskopischen Eigenschaften verändern.^[262,266] In wässriger oder polarer Umgebung weisen sie niedrige Quantenausbeuten auf, wohingegen sie in apolaren Lösungsmittel bzw. in lipophiler Umgebung wie zum Beispiel in hydrophoben Bindetaschen stark fluoreszierend sind. Die Fluoreszenz von 4-DMAP verschiebt sich dabei zu höheren Wellenlängen und die Quantenausbeute steigt um das ca. 70fache.^[264,265,267-269]

Die in Abbildung 48 gezeigten Fluorophore sind zudem synthetisch leicht zugänglich bzw. kommerziell erhältlich und lassen sich leicht durch Alkylierung oder Reaktion mit einem primären Amin einführen.



Abbildung 48: Fluorophore für pharmakologische Tools, λ_{\max} (em) aus ^[165,262,264,265,270]

Um die damals noch unbekannte Bindetasche des SIP_1 -Rezeptors näher charakterisieren können bzw. die an der Bindung beteiligten Aminosäuren identifizieren zu können, wurden einige Derivate synthetisiert, die zum kovalenten Labeling fähig sind und auch als irreversible Inhibitoren eingesetzt werden. Zur Ausbildung der kovalenten Bindung wurden Acrylamide als reaktive Gruppe gewählt, da sie aufgrund des HSAB-Prinzips (*hard-acid soft-bases*) bevorzugt mit Thiolen reagieren und Cysteine in den meisten Proteinen eine relative geringe Häufigkeit besitzen. Diese spezifische Wechselwirkung zwischen Thiol und Acrylamid führt zudem auch zu weniger unspezifischen Reaktionen.^[183,184]

In Abbildung 49 ist die Kristallstruktur^[63] des S1P₁-Rezeptors gezeigt. In rosa dargestellt, sind Cysteine die eine Disulfidbrücke ausbilden und somit keine Wechselwirkung mit Acrylamiden eingehen können (Cys184, Cys191, Cys282, Cys287). Alle anderen Cysteine sind pink eingefärbt, wobei nur Cys 206 innerhalb Bindetasche liegt und mit einem mit Acrylamid-versehenen Liganden eine kovalente Bindung ausbilden könnte.

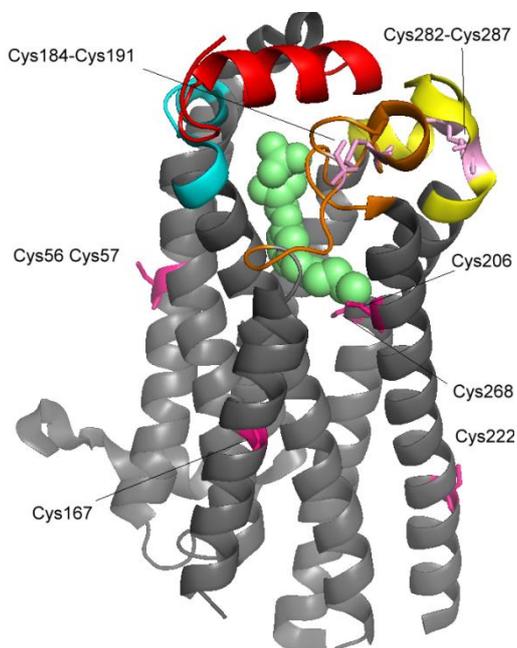
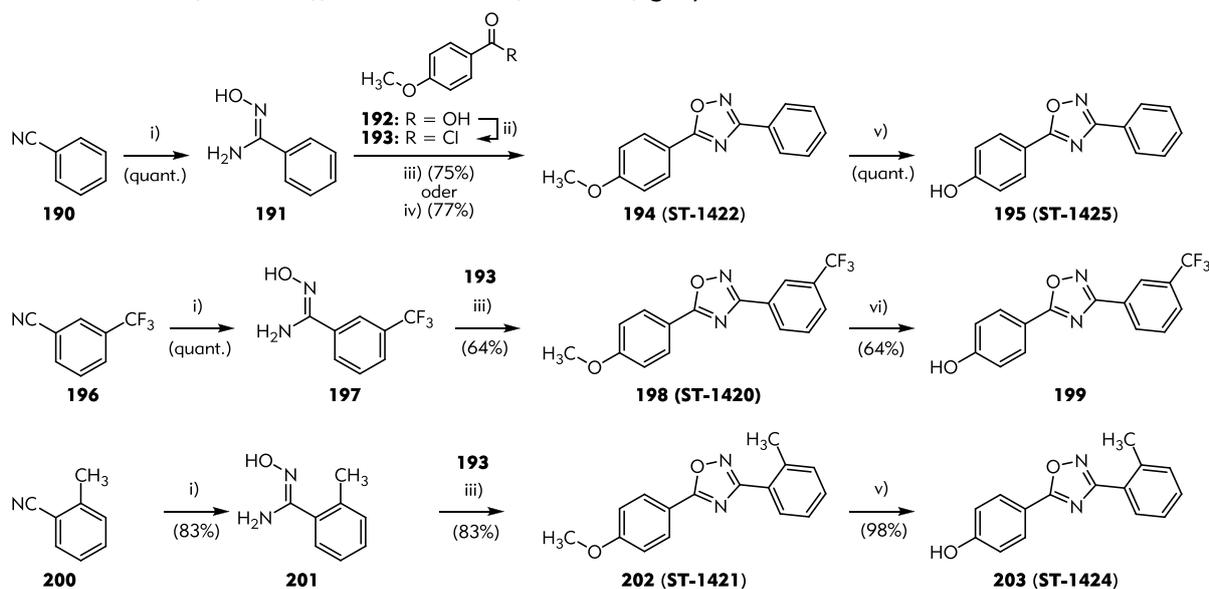


Abbildung 49: Kristallstruktur des S1P₁-Rezeptor (pdb: 3V2Y): Cysteine in pink bzw. Cysteine in Disulfidbrücken in rosa.^[63]

4.1.2. Synthesen

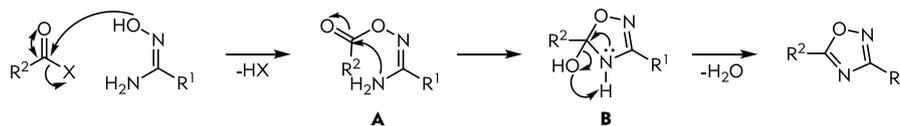
4.1.2.1 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Grundstrukturen

Der Aufbau der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Grundstruktur erfolgte wie in Schema 1 dargestellt aus einem *N'*-Hydroxybenzamidin und einer aktivierten Carbonsäure. Die *N'*-Hydroxybenzamidine **190**, **196** und **200** wurde jeweils aus dem Nitril durch Umsetzung mit Hydroxylamin · Hydrochlorid gewonnen.^[271] Der Ringschluss zum 1,2,4-Oxadiazole erfolgte entweder mit 4-Methoxybenzoylchlorid, **193**, durch Erhitzen unter Rückflussbedingungen in Pyridin^[272] oder in einer Mikrowellensynthese^[273] mit der Benzoesäure **192** und den Aktivierungsreagenzien *N'*-((Ethylimino)methylen)-*N*³,*N*³-dimethylpropan-1,3-diaminhydrochlorid (EDC*HCl) und 1*H*-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-ol · Monohydrat (HOBT*H₂O). Die Methoxyether **194** (ST-1422), **198** (ST-1420) und **202** (ST-1421) wurden anschließend mit Bortribromid als Lewisäure zu den Phenolen **195** (ST-1425), **199** und **203** (ST-1424) gespalten.^[272]



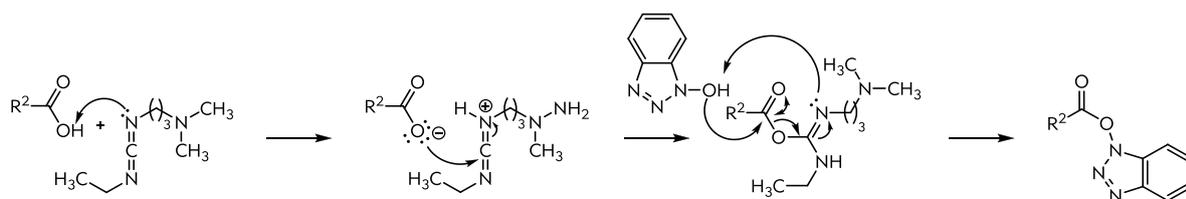
Schema 1: Synthese der phenolischen 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Grundstrukturen **195**, **199** und **203**: i) HO-NH₂*HCl, Na₂CO₃, EtOH, 17 h, Reflux; ii) SOCl₂, Toluol, 4 h, Reflux; iii) **193**, Py, 14-20 h, Reflux; iv) a) **192**, EDC*HCl, HOBT*H₂O, abs. DMF, 1 h, RT, b) **191**, abs. DMF, 20 min, 180 °C, μ w; v) BBr₃, abs. DCM, 16 h, -45 °C → RT; vi) 1M BBr₃, abs. DCM, 48 h, -45 °C → Reflux.

Der Reaktionsmechanismus des Ringschlusses zum 1,2,4-Oxadiazol ist in Schema 2 gezeigt. Die Hydroxygruppe des *N'*-Hydroxybenzamidins reagiert zunächst mit der aktivierten Carbonsäure zum Oxybenzamidin **A**, welches unter Wasserabspaltung über **B** ein Imin bildet und somit den Ring zum 1,2,4-Oxadiazol schließt.



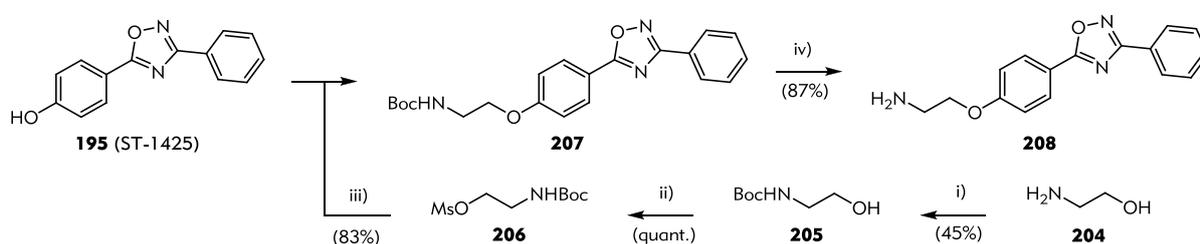
Schema 2: Mechanismus des 1,2,4-Oxadiazolringschlusses: R¹/R² = Alkyl, Aryl; X = -Cl, -OBt^[274]

Als aktivierte Carbonsäure können unter anderem Säurechloride oder durch verschiedenste Reagenzien aktivierte Carbonsäuren verwendet werden. In Schema 3 ist die Aktivierung mittels EDC und HOBT gezeigt. Die Säure reagiert mit EDC zum gemischten Anhydrid des O-Acylisoharnstoffs. Dieser reagiert unter thermodynamischer Kontrolle mit HOBT zur aktivierten Carbonsäure.



Schema 3: Mechanismus der Carbonsäureaktivierung mit EDC und HOBt ($R^2 = \text{Alkyl, Aryl}$)^[273]

Da viele Fluorophore, vor allem kommerziell verfügbare, mit primären Aminen reagieren, wurde zunächst eine Synthese des Ethoxyamin-Derivats **208** entwickelt. Da weder die direkte Alkylierung des Phenols **195** mit 2-Bromethanamin Hydrobromid noch eine alternative Route – Umsetzung von **195** mit Chloracetamid gefolgt einer Reduktion des Amids zum Amin – zufriedenstellende Ergebnisse lieferten, wurde ein etwas längerer Syntheseweg ausgehend von Ethanolamin (**204**) gewählt (Schema 4).

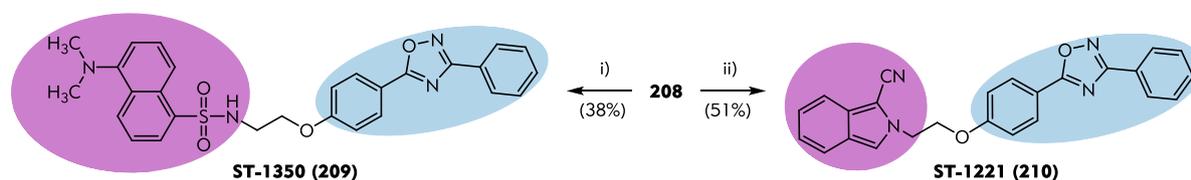


Schema 4: Synthese von 2-(4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethanamin, **207**: i) Boc_2O , abs. DCM, 18 h, RT; ii) MsCl , Py, abs. DCM, 1 h, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$; iii) Cs_2CO_3 , abs. DMF, 14 h, 90°C ; iv) TFA, abs. DCM, 3 h, RT.

Ethanolamin (**204**) wurde Boc-geschützt (**205**)^[275], mesyliert (**206**)^[276] und anschließend mit dem Phenol **195** zu **207** alkylert^[277]. Dabei zeigte sich, dass bei der Verwendung von Caesiumcarbonat statt Kaliumcarbonat als Base eine ca. 30% höhere Ausbeute erzielt werden kann, was auf die Größe des Gegenions zurückgeführt werden kann. Nach saurer Hydrolyse wurde das freie Amin **208** erhalten.^[278]

4.1.2.2 Fluoreszenzmarkierte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole

Das primäre Amin **208** wurde mit verschiedenen aminreaktiven Fluorophoren zu den pharmakologischen S1P₁-Tools gekoppelt. Die Umsetzung mit Dansylchlorid (DsCl) lieferte **ST-1350 (209)** (Schema 5). Zur Synthese des entsprechenden 2H-Isoindolcarbonitrilderivats **ST-1221 (210)** wurde **208** mit o-Phthaldialdehyd und Natriumcyanid in Methanol behandelt.^[279]

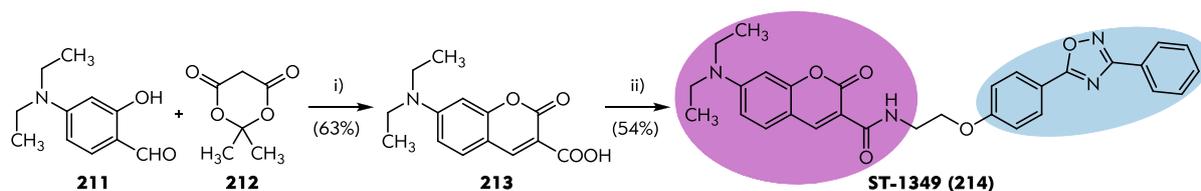


Schema 5: Synthese von **ST-1350 (209)** und **ST-1221 (210)**: i) DsCl, abs. DMF, 24 h, RT; ii) o-Phthaldialdehyd, NaCN, abs. MeOH, 15 h, RT.

Für die Synthese eines Coumarin-gelabelten Oxadiazols wurde zunächst 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (**213**) ausgehend vom Salicylaldehyd **211** und Meldrumssäure (**212**) synthetisiert.^[280] Dabei kann die Knoevenagel-Reaktion zur Säure **213** statt mit Piperidin und Essigsäure auch mit Ammoniumacetat in Wasser durchgeführt werden.^[281] Die mit EDC und

4.1.2.2 Fluoreszenzmarkierte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole

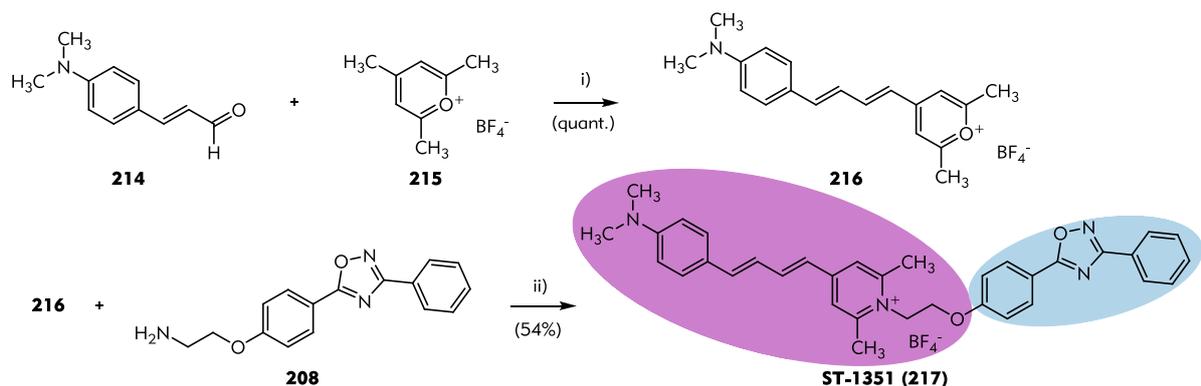
HOBt aktivierte Säure **213** wurde in einer mikrowellenassistenten Amidbildung mit **208** zu **ST-1349 (214)** umgesetzt.^[273]



Schema 6: Synthese von **ST1349 (214)**: i) Piperidin, HOAc, abs. EtOH, 30min, RT, 3 h Reflux; ii) EDC, HOBt*H₂O, abs. DMF, 30 min, RT dann **208**, abs. DMF, 10 min, 100 °C, μ w.

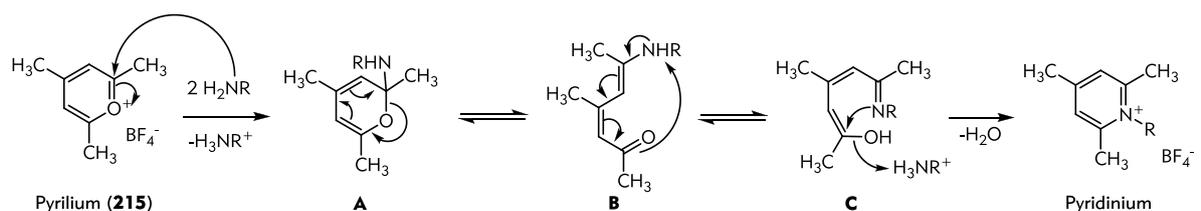
Neben den kleinen Fluorophoren (Dansyl, 2*H*-Isoindolcarbonitril, Coumarin) wurde auch ein Derivat mit einem pyrylium-basierten Fluorophor synthetisiert. Pyryliumbasierte Fluorophore bzw. deren Konjugate weisen rotverschobene Absorptions- und Emissionsmaxima auf, weshalb sie sich besonders gut für Zellexperimente eignen (vgl. 2.3 Pharmakologische Tools: Molekulares Imaging und Labeling, S. 37). Die Pyridiniumkonjugate des Pyryliumsalzes **216** mit primären Aminen absorbieren bei ca. 465 nm und emittieren bei ca. 630 nm.^[270,282,283]

4-(Dimethylamino)zimtaldehyd (**214**) wurde mit dem Pyrylium Salz **215**, das an seiner *para*-Methylgruppe in Form eines vinylogenen Keteniumions reagiert,^[284] in einer aldolartigen Reaktion zum Pyrylium Salz **216** umgesetzt (Schema 7). **ST-1351 (217)** wurde durch Reaktion mit dem primären Amin **208** erhalten.^[270,285]



Schema 7: Synthese des Pyridiniumderivats **ST-1351 (217)**: i) abs. MeOH, 17 h, RT, Ar; ii) NEt₃, abs. DMF/MeCN (1:1), 14 h, RT.

Der Mechanismus der Pyrylium-Pyridinium-Umsetzung beginnt mit der Addition des primärenamins an Position 2/6 des Pyryliums (Schema 8). Das instabile 2*H*-Pyran Intermediat **A** reagiert unter Ringöffnung zum divinylgen Amid **B**. Intermediat **B** tautomerisiert langsam zum Iminoenol **C**, dass unter Wasserabspaltung zum Pyridiniumprodukt zyklisiert.^[282]

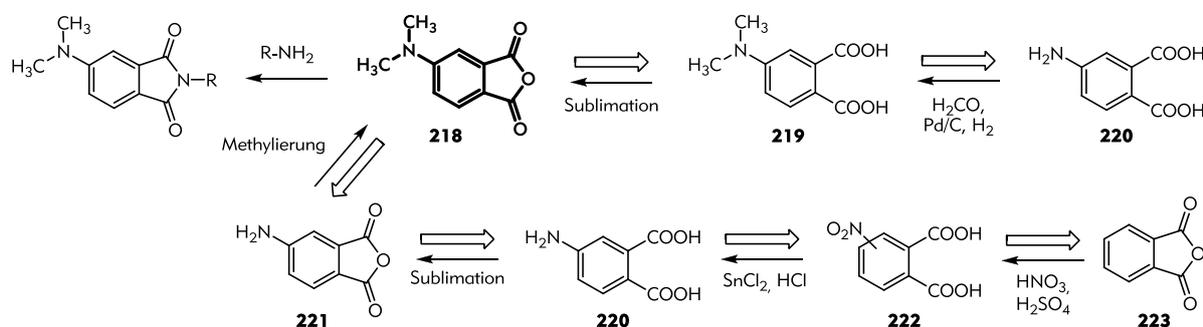


Schema 8: Mechanismus der Reaktion von Pyryliumionen mit primären Aminen zu Pyridiniumionen.^[282]

4.1.2.3 4-DMAP-gelabelte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole

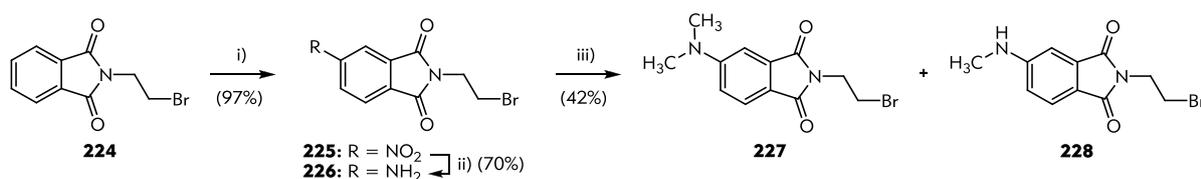
Im Gegensatz zu anderen Fluorophoren sind keine 4-(Dimethylamino)phthalimid-basierten (4-DMAP) Labellingreagenzien kommerziell verfügbar. 4-(Dimethylamino)phthalsäureanhydrid (**218**) kann mit primären Aminen, wie **208**, zum entsprechenden 4-DMAP-gelabelten Produkt umgesetzt werden (Schema 9). Das Anhydrid **218** kann durch Sublimation bzw. Dehydratisierung aus der Phthalsäure **219** erhalten werden. Verbindung **219** ist unter reduktiven Bedingungen aus **220** und Formaldehyd zugänglich. Dieser mögliche Syntheseweg für das aminreaktive 4-(Dimethylamino)phthalsäureanhydrid, **218**, wurde nicht gewählt, da **220** nicht kostengünstig verfügbar ist.

Eine kostengünstigere Alternative stellt die Route über Phthalsäureanhydrid (**223**) dar. Sie kann nitriert (**222**) und zu **220** reduziert werden. Eine anschließende Umsetzung zum Anhydrid gefolgt von Methylierung des Amins würde **218** zugänglich machen. Die Nitrierung würde jedoch ein Gemisch aus 3- und 4-Nitrophthalsäure liefern, dessen Trennung nach Onnertz und Miller^[286,287] als schwierig mit nur geringer Ausbeute beschrieben wird.



Schema 9: Synthetische Überlegungen zur Synthese von 4-DMAP-Derivaten

Da Dimethylaminophthalsäureanhydrid (**218**) nicht einfach synthetisch zugänglich und zugleich kostengünstig ist, wurde eine Synthesestrategie über 4-(Dimethylamino)phthalimid (4-DMAP) entwickelt. Um den konvergenten Charakter beizubehalten, wurde zunächst eine Synthese zum *N*-(2-Bromethyl)-4-(Dimethylamino)phthalimid **227** entwickelt (Schema 10). *N*-(2-Bromethyl)phthalimid (**224**) wurde unter klassischen Bedingungen zu **227** nitriert^[288] und anschließend mit Zinndichlorid in Salzsäure zum Amin **226** reduziert.^[288] Die zweifache Methylierung zu **227** wurde unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Reagenzien durchgeführt. Die Umsetzung mit Methyljodid (2.3 eq, 3 d, RT) lieferte nur ca. 5% Umsetzung zu **227**. Durch einen großen Überschuss an Methyljodid (20 eq, 2 d, Reflux) konnte ein 1:1:0.2 Gemisch aus Edukt, monomethyliertem Produkt **228** und Produkt **227** isoliert werden. Durch die Verwendung von Dimethylsulfat als Methylierungsmittel (6 eq, 1.5 h, 150 °C) und Kaliumhydroxid konnte **227** in 25% Ausbeute isoliert werden (nach säulenchromatographischer Trennung). Die Verkürzung der Reaktionszeit auf eine Stunde und der Verzicht auf eine Base minimierte die Bildung von **228** und lieferte **227** mit einer Ausbeute von 42%.^[289]



Schema 10: Synthese von *N*-Bromomethyl-4-DMAP, **227**: i) konz. HNO₃, konz. H₂SO₄, 1 h, RT → 50 °C; ii) SnCl₂, HCl, 1.5 h, 50 °C; iii) 5 eq. Me₂SO₄, 1 h, 150 °C.

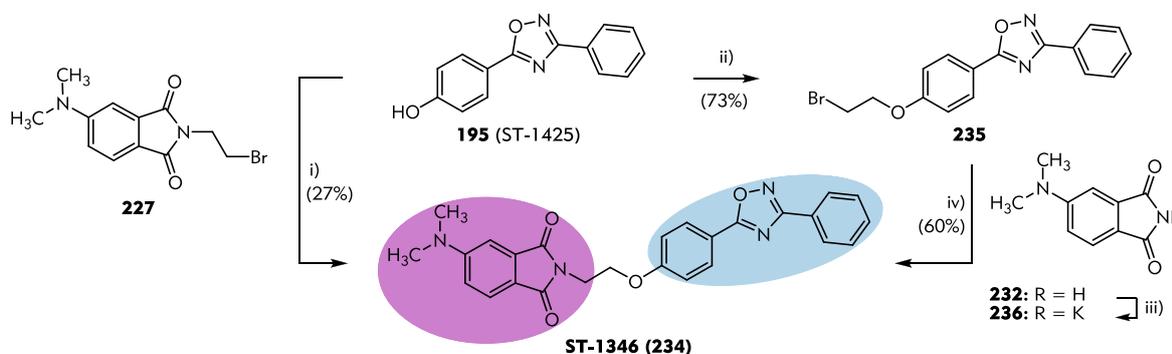
4.1.2.3 4-DMAP-gelabelte 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole

Parallel dazu wurde 4-(Dimethylamino)phthalimid (**232**) in gleicher Art und Weise synthetisiert (Schema 11).^[267] Im Gegensatz zur Reduktion von **225** zu **226** konnte **231** durch Vakuumfiltration leicht aufgereinigt werden, wohin gegen **226** mit großen Mengen Lösungsmittel extrahiert werden musste. Die Dimethylierung zu **232** verlief ähnlich zu der von **227**. Methylierung mit Dimethylsulfat unter Mikrowellenbestrahlung (30 min, 130 °C) resultierte in 4% **232**. Durch reduktive Aminierung mit Formaldehyd und Natriumtriacetoxyborhydrid^[290] bzw. Wasserstoff und Palladium/Kohle konnte keinerlei Umsetzung erzielt werden. Methylierung mit Dimethylsulfat^[267] unter konventioneller Bedingungen, nach Optimierung der Reaktionszeit und der Temperatur, lieferte **232** in 41% Ausbeute. Unter diesen Bedingungen wurde das monomethylierte Produkt **233** nur zu ca. 17% gebildet und konnte durch säulenchromatographischer Aufreinigung abgetrennt werden.



Schema 11: Synthese von 4-DMAP, **232**: i) konz. HNO₃, konz. H₂SO₄, 1 h, RT → 50 °C; ii) SnCl₂, HCl, 1.5 h, 50 °C; iii) 5 eq. Me₂SO₄, 2 h, 130 °C.

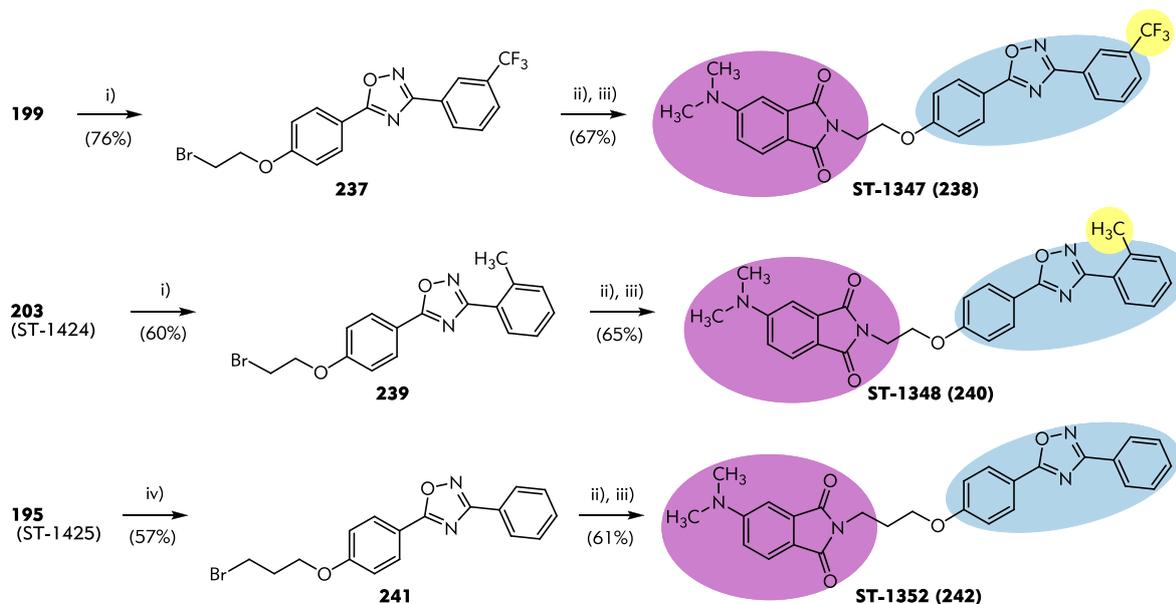
Sowohl **232**, als auch **227** wurden weiter zum 4-DMAP-gelabelten Oxadiazol **ST-1346** (**234**) umgesetzt (Schema 12). Durch Alkylierung^[291] des Phenols **195** mit einem Überschuss an **227** konnte **234** mit einer Ausbeute von 27% erhalten werden. Die Alkylierung von **195** mit Dibromethan zu 5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol, **235**, hingegen verlief deutlich besser. Verbindung **235** wurde in 73%iger Ausbeute isoliert und mit dem Kaliumsalz von **232**, **236**, zu **ST-1346** (**234**) umgesetzt werden.^[267]



Schema 12: Synthese von **ST-1346** (**234**): i) 1.8 eq **227**, Cs₂CO₃, abs. DMF, 48 h, 50 °C; ii) 19 eq Br(CH₂)₂Br, 5 eq Cs₂CO₃, abs. DMF, 21 h, 80 °C; iii) KOH, abs. EtOH, 2 h, 70 °C; iv) abs. DMF, 24 h, 80 °C.

Die Syntheseroute über 4-DMAP (**232**) erwies sich als eleganter, da sie bei beim Aufbau des Fluorophorbausteins in einigen Schritten eine erleichterte Aufarbeitung bietet. Vor allem liefert sie im Alkylierungsschritt des Phenols bessere Ausbeuten, da Dibromethan im größeren Überschuss eingesetzt werden kann. Die Synthese der 4-DMAP-gelabelten Methyl- und Trifluormethyl-substituierten Oxadiazole erfolgte deswegen über den analogen Weg (Schema 13). Die entsprechenden Phenole wurden mit einem Überschuss an 1,2-Dibromethan zu **238** und **240** alkyliert und anschließend mit Kalium 4-DMAP (**237**) zu den gelabelten Derivaten **ST-1347** (**238**) und **ST-1348** (**241**) umgesetzt. Um den Einfluss des Linkers zwischen Oxadiazol und dem Fluorophor bewerten zu können wurde auch ein mit einem Propyllinker verknüpftes Derivat, **ST-1352** (**242**), in analoger Weise hergestellt.

4.1.2.4 Coumarin-Triazol-gelabeltes 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol

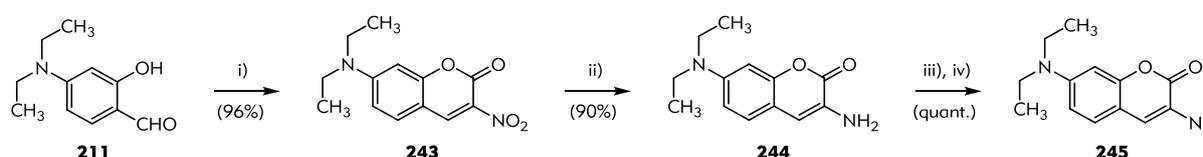


Schema 13: Synthesen von **ST-1347 (238)**, **ST-1348 (241)** und **ST-1352 (242)**: i) 19 eq Br(CH₂)₂Br, Cs₂CO₃, abs. DMF, 20-48 h, 80 °C; ii) KOH, abs. EtOH, 2 h, 70 °C; iii) abs. DMF, 22-48 h, 80 °C; iv) 19 eq Br(CH₂)₃Br, Cs₂CO₃, abs. DMF, 21 h, 80 °C.

4.1.2.4 Coumarin-Triazol-gelabeltes 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol

Coumarinfluorophore verändern ihre Absorptions- und Emissionseigenschaften in Abhängigkeit der Substituenten. So weist das Amid der Diethylaminocoumarincarbonsäure ein Emissionsmaximum bei ca. 400 nm auf und das Triazol verknüpfte Analogon ein um ca. 50 nm rotverschobenes Emissionsmaximum auf.^[292] Zudem sind Triazole aus terminalen Alkynen und Aziden, über die Huisgen-Cycloaddition („Click-Reaktion“),^[293] leicht und in guten Ausbeuten zugänglich und eignen sich auch für *In vivo*-Labeling-Experimente.^[292,294,295]

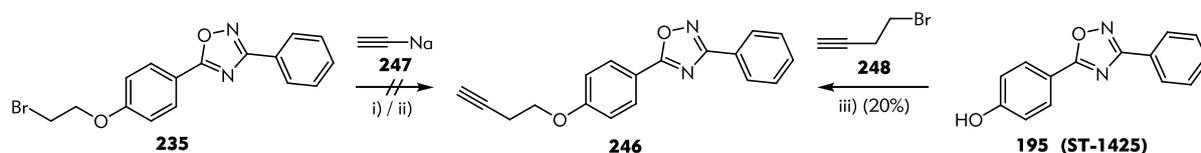
Das entsprechende 3-Azidocoumarin **245** wurde in sehr guten Ausbeuten nach literaturbekannten Synthesen hergestellt (Schema 14). Der Salicylaldehyd **211** wurde am Wasserabscheider mit Ethylnitroacetat nahezu quantitativ zum Nitrocoumarin **243** kondensiert^[296] und anschließend mit Zinnchlorid zum Amin **244** reduziert. Verbindung **244** wurde durch Diazotierung und anschließende Behandlung mit Natriumazid in das 3-Azidocoumarin **245** überführt.^[294]



Schema 14: Synthese von 3-Azido-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-on, **245**: i) O₂NCH₂COOEt, Piperidin, abs. Toluol, Dean-Stark, 24 h; ii) SnCl₂, konz. HCl, 4 h, RT; iii) NaNO₂, 5M HCl, 1 h, 0 °C; iv) NaN₃, 5 h, 0 °C.

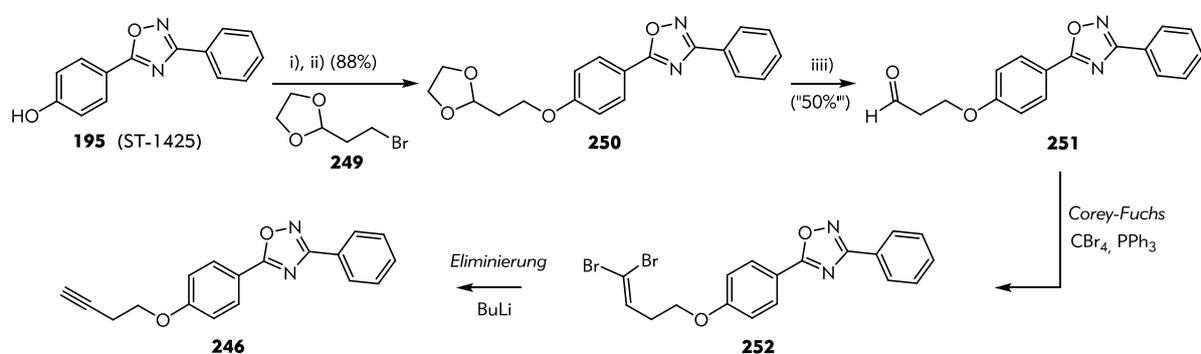
Das entsprechende Alkyn **246** (Schema 15) sollte ausgehend vom Bromid **235** durch Substitution mit Natriumacetylen (**247**)^[297] synthetisiert werden. Sowohl bei Reaktion in DMF mit verschiedenen Äquivalenten **247** bei verschiedenen Temperaturen, als auch bei Reaktion in Xylol konnte **246** nicht isoliert werden - nur das Eliminierungsprodukt von **235** und das Phenol **195** wurden in ca. 85%igen Gesamtausbeute erhalten. Die Alkylierung von 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) mit 4-Brombutyn (**248**) wurde als alternativer Syntheseweg gewählt.^[291,298,299] Verschiedensten Reaktionsbedingungen und Äquivalente an **248** wurden zur Synthese von **246** angewendet: 1.0-6.0 eq **246**, Cs₂CO₃/K₂CO₃/NaH, NaI, abs. DMF/MeCN/Aceton, 5-18 h, 0-100 °C. Nur im Fall der Finkelstein-Alkylierung (Aceton, NaI, K₂CO₃, 2 x 3 eq

248) konnte das Produkt **246** in 13%, neben 77% unreaktiertem Phenol **195**, erhalten werden. Unter den anderen Bedingungen trat keine Reaktion ein. Die Ausbeute der Finkelstein-Alkylierung konnte durch mikrowellenassistenten Reaktion auf 20 % gesteigert werden.



Schema 15: Synthese von 5-(4-(But-3-ynoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol, **246**: i) 1.2 eq - 2.4 eq **247**, abs. DMF, 48 h, 0 °C -> RT; ii) 1.5 eq **247**, Xylol, 18 h, 0 °C -> Reflux; iii) 3eq **248**, 3 eq K₂CO₃, NaI, abs. Aceton, 40 min, 130 °C, μ w.

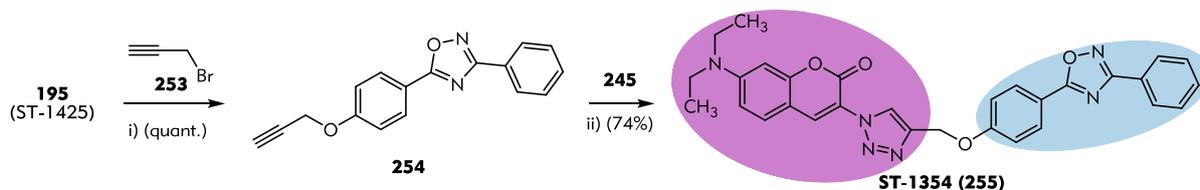
Da die Alkylierung nicht weiter optimiert werden konnte, wurde eine Synthese zum Aufbau der Dreifachbindung des Alkin **246** entwickelt (Schema 16).^[300]



Schema 16: Alternative Syntheseroute zu 5-(4-(But-3-ynoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol, **246**: i) K₂CO₃, abs. Aceton, 2 h, Reflux; ii) **249**, abs. Aceton, 22 h, Reflux; iii) HOAc, 10 h, 90 °C.

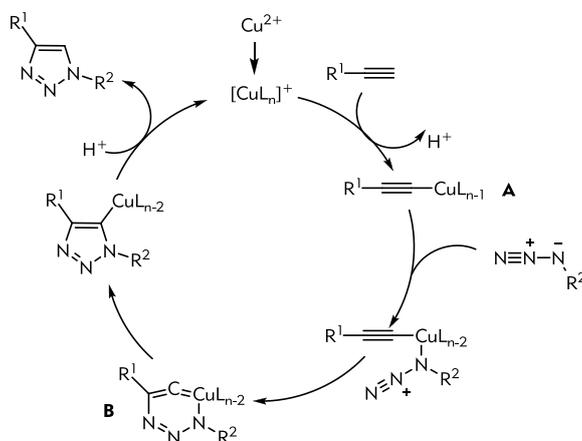
Die Alkylierung von 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) mit 2-(2-Bromomethyl)-1,3-dioxolan (**249**) in Aceton lieferte den geschützten Aldehyd **250**. Durch Erwärmen des Acetals in einer 4:1 Mischung aus Essigsäure und Wasser^[300] (50 Stunden, 50 °C) konnte keinerlei Freisetzung des Aldehyds erzielt werden. Das re-isolierte Acetal **250** wurde mit Salzsäure in einem THF-Isopropanol-Gemisch (20 Stunden, RT) behandelt, wobei der Arylether quantitativ gespalten wurde. Daher wurde **250** nun bei 90 °C mit einer 4:1 Mischung aus Essigsäure und Wasser über 10 Stunden erhitzt. Es konnte eine 1:1 Mischung aus dem freiem Aldehyd und dem Phenol **195** erhalten werden. Eine chromatographische Trennung gelang nicht, so dass die geplante Corey-Fuchs Reaktion zum Dibrombutenyloxy Derivat **252** und die anschließende Eliminierung zu **246** nicht durchgeführt werden konnten.^[300]

Alle Versuche 5-(4-(But-3-ynoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**246**) zu synthetisieren erwiesen sich als nicht brauchbar, so dass das um einen Kohlenstoff kürzere 3-Phenyl-5-(4-(prop-2-ynoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol (**254**) synthetisiert wurde (Schema 17). Die Alkylierung mit Propargylbromid (**253**) und Caesiumcarbonat als Base lieferte **254** in quantitativen Ausbeuten. Verbindung **254** wurde mit dem Azid **245** in einer kupferkatalysierten „Click-Reaktion“ in das Triazol **ST-1354** (**255**) überführt. Dabei wurde das katalytisch aktive Kupfer (I) *in situ* durch Reduktion mit Natriumaskorbat erzeugt.



Schema 17: Synthese von 7-(Diethylamino)-3-(4-((4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromen-2-on, **ST-1354 (255)**: i) 11 eq **253**, Cs_2CO_3 , abs. DMF, 4 h, 80 °C; ii) Natriumaskorbat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, DCM:H₂O 1:1, 16 h, RT.

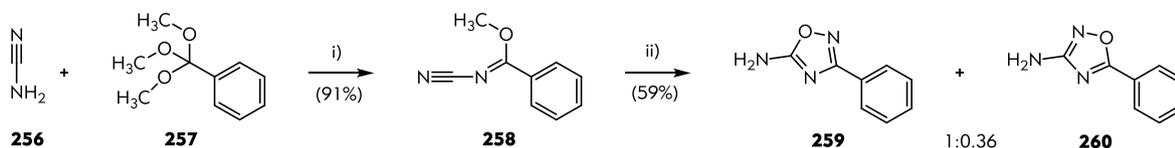
Der Katalysezyklus der Huisgen Cycloaddition startet nach Himo *et al.*^[301] mit der Bildung von Kupfer(I)-Acetylid (**A**). Nach Koordination des Azids an das Kupfer findet ein stufenweiser Ringschluss, über einen kupferhaltigen Sechsring (**B**) zum Triazol statt. Zum Schluss wird das Kupfer(I) gegen ein Proton ausgetauscht (Schema 18).



Schema 18: Katalysezyklus der Huisgen Cycloaddition („Click-Reaktion“): R¹/R² = Alkyl, Aryl. nach^[301]

4.1.2.5 5-Fluorophor-3-Aryl-1,2,4-Oxadiazol

Statt das Fluorophore mit dem Oxadiazolgrundgerüst über einen Linker zu verbinden, kann es auch ein Teil dessen sein und den Platz des 5-Phenylrings einnehmen. Dazu wurde 3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-amin (**259**) ausgehend von Cyanamid (**256**) und Trimethoxymethylbenzol (**257**) synthetisiert (Schema 19).^[302] Methyl *N*-Cyanobenzimidat (**258**) das in guten Ausbeuten erhalten werden könnte, wurde im nächsten Schritt mit Hydroxylamin zum Aminooxadiazol umgesetzt. Die im Verhältnis 1:0.36 entstandenen Regioisomere **259** und **260** konnten säulenchromatographisch getrennt werden.



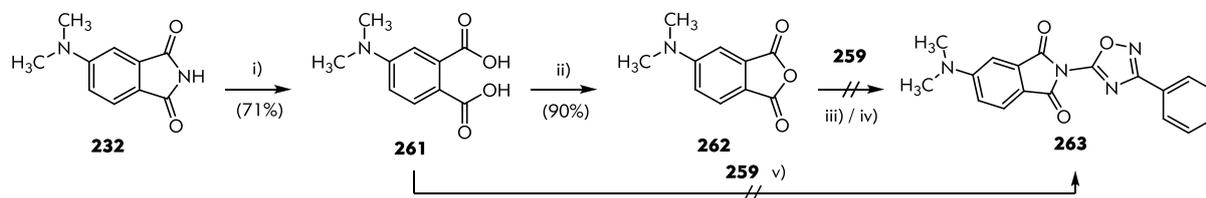
Schema 19: Synthese von 3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-amin **259**: i) Ac_2O , 45 min, 135 °C; ii) $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, NEt_3 , abs. MeOH, 1 h, RT.

Um 4-DMAP im Oxadiazolgrundgerüst inkorporieren zu können, musste ein aminreaktives Derivates synthetisiert werden (Schema 20). Dazu wurde **232** mit Natriumhydroxid in die Phthalsäure **261** überführt und anschließend mit Essigsäureanhydrid zum Anhydrid **262** dehydratisiert.^[303] **262** wurde mit dem aromatischen Amin **259** unter verschiedenen Bedingungen in der Mikrowelle umgesetzt. Sowohl bei Reaktion mit Essigsäure^[304,305] bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten, als auch mit Triethylamin in DMF konnte keinerlei Umsetzung beo-

4.1.2.5 5-Fluorophor-3-Aryl-1,2,4-Oxadiazol

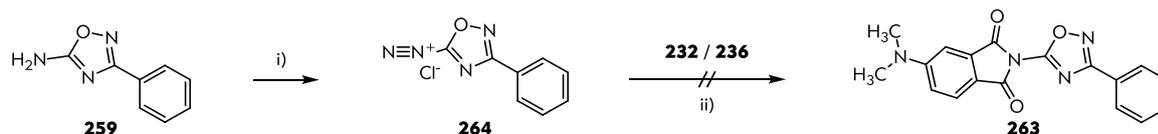
bachtet werden. Die direkte Reaktion zwischen der Phthalsäure **261** und dem Amin **259** mit und ohne Säureaktivierungsreagenzien lieferte ebenfalls keine Umsetzung.

Auch in der Reaktion zwischen **259** und *ortho*-Phthaldialdehyd mit Natriumcyanid (nicht gezeigt in Schema 20), unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, zum entsprechenden 2*H*-Isoindolcarbonitril-gelabelten Produkt konnte **259** quantitativ re-isoliert werden.



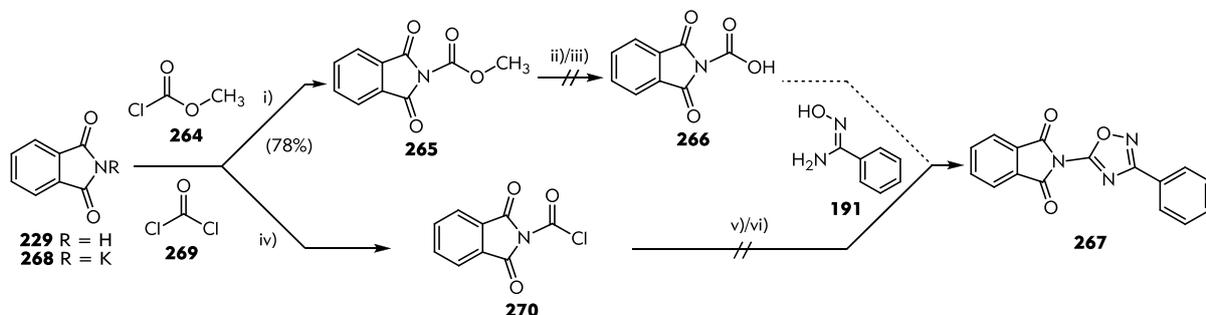
Schema 20: Syntheseroute zu 5-(Dimethylamino)-2-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)isoindolin-1,3-dion, **263**: i) 1.5M NaOH, 15 min, 160 °C, $\mu\omega$; ii) Ac₂O, 15 min, 160 °C, $\mu\omega$; iii) HOAc, 15-30 min, 140-180 °C, $\mu\omega$; iv) NEt₃, abs. DMF, 15 min, 150 °C, $\mu\omega$; v) (EDC, HOBT*H₂O), abs. DMF, 10-30 min, 100-120 °C, $\mu\omega$.

Da die direkte Reaktion des aromatischen Amins **259** mit Phthalsäurederivaten nicht gelang, wurde ein Syntheseweg über Diazotierung und nukleophile, aromatische Substitution gewählt (Schema 21). Verbindung **259** wurde mit Natriumnitrit in HCl behandelt (**264**) und eine Lösung aus 4-DMAP (**232**) bzw. dem Kaliumsalz (**236**) wurde hinzugegeben.^[306] **263** konnte in beiden Fälle nicht isoliert bzw. nachgewiesen werden – es wurden die Edukte isoliert.



Schema 21: Syntheseweg von **263** über Diazotierung und nukleophile, aromatische Substitution: i) NaNO₂, Konz. HCl, 2 h, 0 °C; ii) THF/DMF, 2/12 h, 0 °C → RT/80 °C.

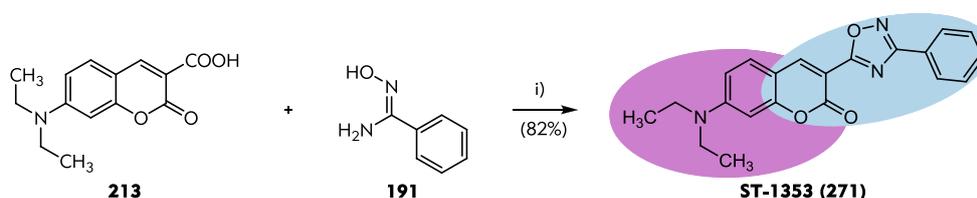
Eine andere retrosynthetische Zerlegung von **263** führt zu 5-(Dimethylamino)-phthalimid-*N*-carbonsäure (**266**) und (*Z*)-*N'*-Hydroxybenzamidin (**191**) als Edukte (Schema 22). Zu Testzwecken wurden die entsprechenden Synthesen mit Phthalimid (**229**) durchgeführt. Verbindung **191** wurde mit Chlorameisensäuremethylester (**264**) in den Ester **265** überführt.^[307] Die Spaltung zur Carbonsäure **266**^[308] war unter den gewählten Bedingungen nicht möglich – mikrowellenassistede Spaltung mit Lithiumchlorid in DMF^[309] und Lithiumhydroxid in THF/Wasser bei RT^[310]. Im Falle der Lithiumchloridspaltung konnte ein Teil des Esters re-isoliert werden und die Behandlung mit Lithiumhydroxid führte zur teilweisen Spaltung des Phthalimidrings.



Schema 22: Syntheseroute zu 2-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)isoindoline-1,3-dion, **267**: i) NEt₃, abs. DMF, 4h, 0 °C → RT; ii) LiCl, abs. DMF, 10 min, 150 °C, $\mu\omega$; iii) LiOH, THF:H₂O (2:1), 3 h, RT; iv) OCl₂ in Toluol, abs. THF, 24 h, -10 °C → RT; v) abs. DMF, 10 min, 150 °C, $\mu\omega$; vi) EDC*HCl, HOBT*H₂O, abs. DMF, 10 min, 150 °C, $\mu\omega$; vii) abs. Pyridin, 15 – 60 min, 150-180 °C.

Als Alternative zur Säure **266** wurde das entsprechende Säurechlorid **270** durch Umsetzung von Kaliumphthalimid (268) mit Phosgen-Lösung (269) hergestellt. Für **270** wurde ein Signal bei 134 ppm im ^{13}C NMR im nachgewiesen.^[311] Phthalimidocarbonylchlorid (**270**) wurde mit und ohne Aktivierungsreagenzien mit *N'*-Hydroxybenzamidin (**191**) in der Mikrowelle erhitzt. Dabei wurde in beiden Fällen die Entstehung von CO_2 beobachtet (Trübung einer Bariumhydroxid-Lösung). Bei der Umsetzung in Pyridin war keine Produktbildung erkennbar.

Die Synthese 4-DMAP-Phenylloxadiazols **263** wurde zu Gunsten eines Diethylaminocoumarin-Analogons **271** aufgegeben. Die bereits synthetisierten Bausteine 7-(Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-carbonsäure (**213**) und (*Z*)-*N'*-Hydroxybenzamidin (**191**) wurden in der Mikrowelle erfolgreich zu 7-(Diethylamino)-3-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-2*H*-chromen-2-on, **ST-1353 (271)**, umgesetzt (Schema 23).

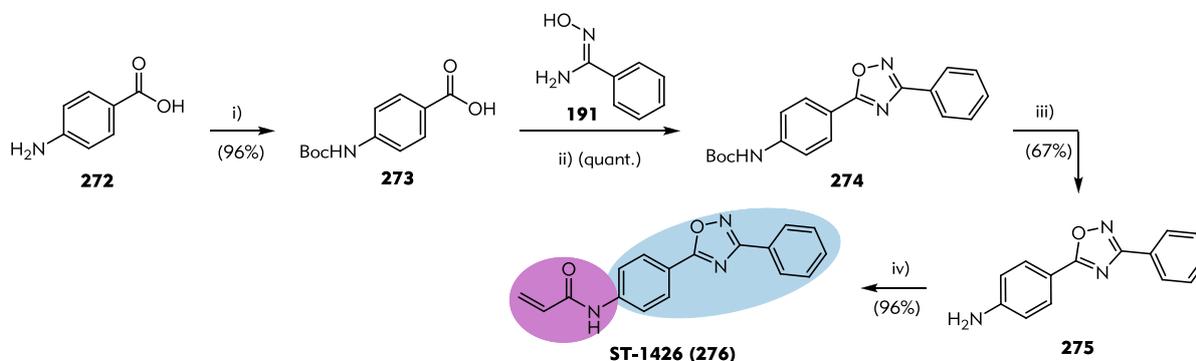


Schema 23: Synthese von 7-(Diethylamino)-3-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-2*H*-chromen-2-on, **ST-1353 (271)**: i): a) **213**, EDC, HOBT* H_2O , abs. DMF, 30 min, RT, b) **191**, abs. DMF, 20 min, 150 °C, μw .

4.1.2.6 Potentiell kovalentbindende Liganden der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol Serie

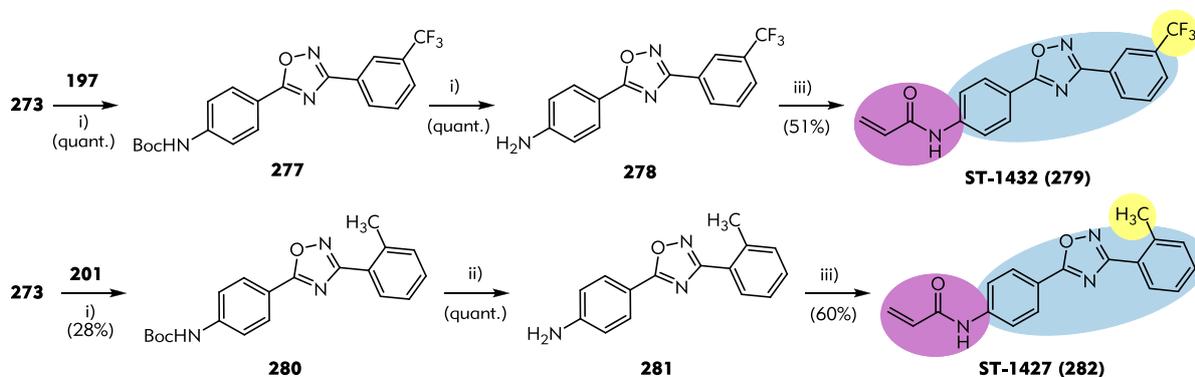
Zur Charakterisierung der damals noch unbekanntes Bindetasche des SIP_1 -Rezeptors wurde eine Reihe von Liganden synthetisiert, die zum kovalenten Labeling fähig sind. Die gewählten Acrylamide können mit Cysteinen in den Seitenketten des Rezeptors eine kovalente Bindung eingehen und somit zur Aufklärung der Aminosäuresequenz der Bindetasche beitragen (vgl. Seite 36).^[153,179,183,184]

Zur Synthese der entsprechenden Acrylamid-Diaryloxadiazol wurde zunächst 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)anilin (**275**) synthetisiert (Schema 24). Dazu wurde *para*-Aminobenzoesäure (**272**) Boc-geschützt (**273**)^[312] und in der Mikrowelle mit **191** zum Oxadiazol **274** ringgeschlossen^[273]. Die Freisetzung zum Amin **275** erfolgte durch Rühren mit Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur.^[278] Durch Umsetzung mit Acrylsäurechlorid konnte *N*-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenyl)acrylamid, **ST-1426 (276)**, in sehr guter Ausbeute erhalten werden.



Schema 24: Synthese von *N*-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenyl)acrylamid, **ST-1426 (276)**: i) Boc_2O , NEt_3 , Dioxan: H_2O (2:1), 19 h, RT; ii): a) **273**, EDC*HCl, HOBT* H_2O , abs. DMF, 1 h RT, b) **191**, abs. DMF, 15 min, 100 °C, μw ; iii) TFA, abs. DCM, 3 h, RT; iv) Acrylsäurechlorid, NEt_3 , CHCl_3 , 24 h, RT.

Das Toly- und Trifluormethylderivat wurde auf dem analogen Syntheseweg erhalten (Schema 25). Nach Ringschluss zwischen 4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)benzoesäure, **273**, und dem entsprechenden *N*'-Hydroxybenzamidin **197** bzw. **201** wurde das jeweilige Amin mit Trifluoressigsäure freigesetzt.^[273,278] Die Amine **278** und **281** wurden mit Acrylsäurechlorid in **ST-1432** (**279**) und **ST-1427** (**282**) überführt.^[313]



Schema 25: Synthese von *N*-(4-(3-(3-(Trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenyl)acrylamid, **ST-1432** (**279**), und *N*-(4-(3-*o*-Tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenyl)acrylamid, **ST-1427** (**282**): i) **273**, EDC*HCl, HOBT*H₂O, abs. DMF, 1 h RT, dann **197/201**, abs. DMF, 15 min, 150 °C, μ w; iii) TFA, abs. DCM, 4.5 h, RT; iv) Acrylsäurechlorid, NEt₃, CHCl₃, 24 h, RT.

4.1.2.7 Optimierung der 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Leitstruktur

Die erste Messung der Bindungsaffinitäten der fluoreszenzmarkierten und der zum kovalent Labeling fähigen Oxadiazol-basierten S1P₁-Liganden, sowie der Oxadiazolgrundstrukturen mittels „Label-Free Affinity Measurement“^[314] lieferte ernüchternde Ergebnisse (s. 5.1.2 Bestimmung der Bindungsaffinitätsmessung S1P₁-Liganden mittels DMR Seite 105). Die synthetisierten Liganden erreichten bei einer Konzentration von 1 μ M maximal 30% des Effektes den SEW2871 (**62**) bzw. S1P am S1P₁-Rezeptor auslösen, und wiesen keine Selektivität gegenüber S1P₂ auf.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ein Diphenyloxadiazol als Pharmakophor nicht ausreichend ist bzw. dass die Leitstrukturen zu stark vereinfacht wurde (vgl. Abbildung 47). Aufgrund dessen wurden zusätzliche Substituenten R³ und R⁴ eingeführt (Abbildung 50). Zu einem wurden Derivate mit polarer Kopfgruppe in Form von Propansäurederivaten^[258-260,315] synthetisiert und zum anderen Trifluormethyl- und Cyano-Substituenten an Position 3 des 5-Phenylrings^[124,130,135,260] eingeführt.

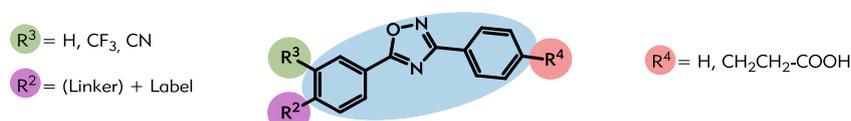
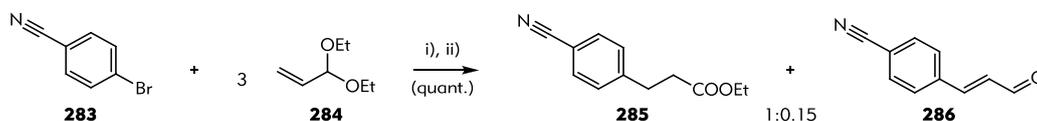


Abbildung 50: Optimierte Leitstruktur mit neuen Substituenten R³ und R⁴.

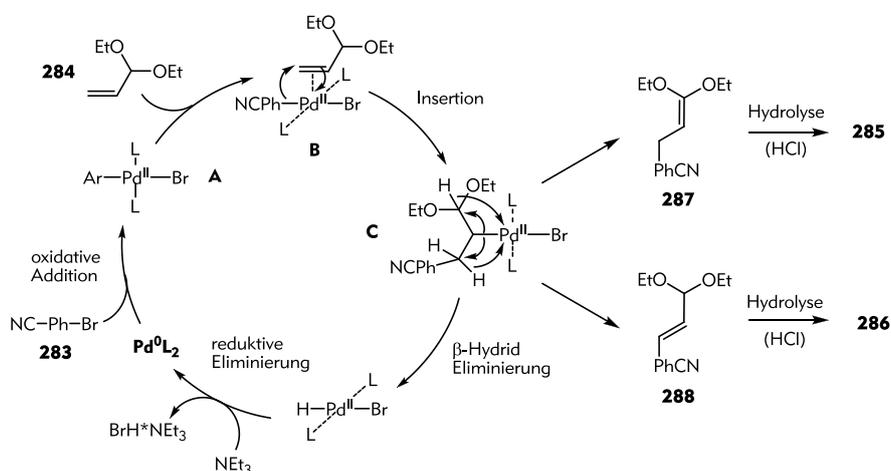
4.1.2.8 Fluoreszenzmarkierten 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazolpropansäurederivate

Zu Aufbau der Propansäurederivate wurde zunächst 3-(4-Cyanophenyl)propansäureethylester (**285**) hergestellt. Die Heck-Reaktion zwischen dem Arylbromid **283** und Acroleindiethylacetal (**284**) lieferte **285** und den Aldehyd **286** im Verhältniss 1:0.15 (Schema 26).^[302,316]



Schema 26: Synthese von 3-(4-Cyanophenyl)propansäureethylester, **285**: i) 0.03 eq Pd(OAc)₂, NBu₃, BrNBu₄, abs. DMF, 21 h, 90 °C; ii) 2M HCl.

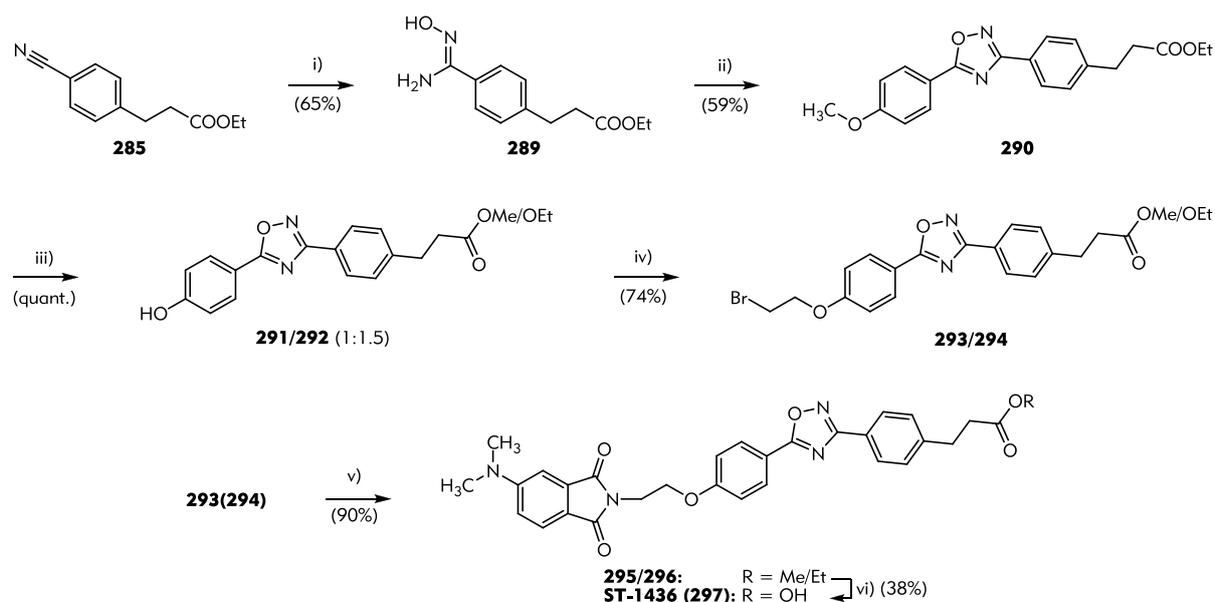
Die Bildung des α,β -ungesättigten Aldehyds **286** kann durch den Katalysezyklus verdeutlicht werden (Schema 27). Nach oxidativer Addition des Bromids **283** (**A**) und Insertion von Acroleindiethylacetal, **284**, (**B**) kann die Eliminierung des Hydrids in **C** an zwei verschiedenen β -Positionen erfolgen. Die eine führt zu **287** und nach Hydrolyse des Acetals zum gewünschten Propansäureester **285**, die Andere über **288** zum α,β -ungesättigten Aldehyd **286**.^[316,317]



Schema 27: Katalysezyklus der Heck-Reaktion zwischen **283** und **284**^[316,317]

3-(4-Cyanophenyl)propansäureethylester (**285**) wurde durch Behandlung mit Hydroxylamin in das *N*¹-Hydroxybenzamidin **289** überführt^[271] (Schema 28). Bei dieser Reaktion wurde ein Teil des Esters **289** gespalten, der sich nicht wieder zu **289** verestern lies. Das *N*¹-Hydroxybenzamidin **289** wurde mit 4-Methoxybenzoesäure (**192**) (Aktivierung mit EDC und HOBT)^[273] in der Mikrowelle mit einer Ausbeute von 59% zum Oxadiazol ringgeschlossen. Die anschließende, quantitative Spaltung des Methylethers^[272] führt zu einem Gemisch aus dem Methylester **291** und Ethylester **292** (ca. 1:1.5). Durch Quenchen der Reaktion mit Methanol, statt mit Wasser, konnte der Anteil an **291** erhöht werden (1:0.2). Eine chromatographische Trennung des Gemisches war nicht möglich, so dass die Mischung mit Dibrommethan alkyliert^[291] wurde (**293/294**). Durch Säulenchromatographie konnte ein Großteil des Ethylester **294** abgetrennt werden. Diese Mischung wurde mit Kalium 4-DMAP (**236**) wiederum zu einem Methyl-/Ethylestergemisch **295/296** umgesetzt^[267], dass säulenchromatographisch und durch Umkristallisation aufgereinigt wurde. Durch Behandlung der mit Methylester angereicherten Estermischung mit einem Gemisch aus Essigsäure und Salzsäure^[318] konnte nur der Methylester **295** zur Säure **ST-1436** (**297**) gespalten werden.

4.1.2.8 Fluoreszenzmarkierten 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazolpropansäurederivate

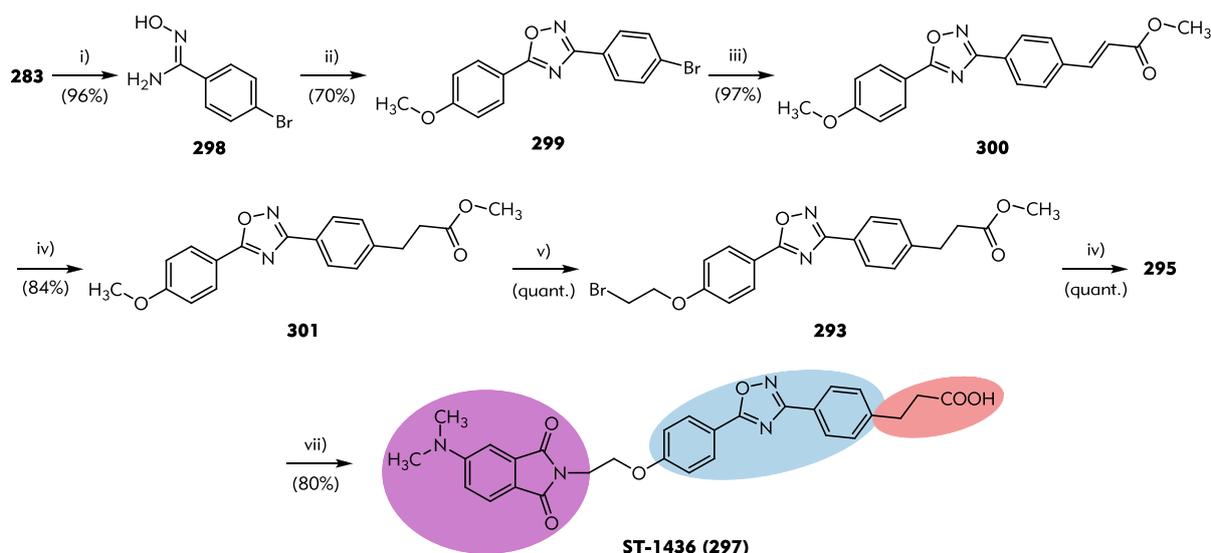


Schema 28: Synthese von **ST-1436 (297)**: i) $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, Na_2CO_3 , EtOH, 17 h, Reflux; ii) **192**, EDC, $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$, abs. DMF, 30 min, RT, dann **289**, abs. DMF, 10 min, 100 °C, μw ; iii) BBr_3 , abs. DCM, 16 h, -30 °C \rightarrow RT; iv) $\text{Br}(\text{CH}_2)_2\text{-Br}$, Cs_2CO_3 , abs. DMF, 18 h, 80 °C; v) **236**, abs. DMF, 21 h, 80 °C; vi) HOAc, HCl (5:1), 5 h, 90 °C.

Der in Schema 28 gezeigte Syntheseweg weist einige Nachteile auf. Die ersten beiden Schritte liefern nur mäßige Ausbeuten. Ab der Etherspaltung muss mit einem Estergemisch gearbeitet werden, dass erst nach der Umsetzung mit 4-DMAP getrennt werden kann. Da die Heck-Reaktion (Schema 26) nicht mit einem Methylderivat durchgeführt werden kann, kann die Problematik der Estergemische nicht von Anfang an vermieden werden. Die Gesamtausbeute über die fünf Schritte beträgt weniger als 10%.

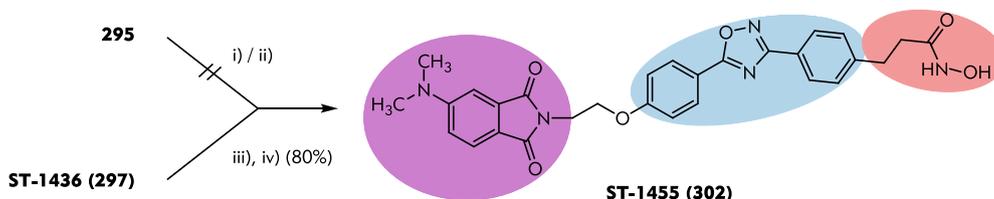
Aus den genannten Gründen wurde eine alternative Synthesestrategie entwickelt, in der zuerst der Oxadiazolring geschlossen wird und dann durch Heck-Reaktion die Propansäure eingeführt wird (Schema 29). 4-Brombenzonitril (**283**) wird nahezu quantitativ in das N' -Hydroxybenzamidin (**298**) überführt und in guten Ausbeuten zum Oxadiazol **299** umgesetzt. Die Heck-Reaktion zwischen dem Bromid **299** und Methylacrylat lieferte (*E*)-Methyl 3-(4-(5-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)acrylat (**300**) in sehr guten Ausbeuten.^[319,320]

Die Reduktion zum Propansäuremethylester **301** erforderte eine ausgiebige Testung von Katalysatoren (Palladium und Platin auf verschiedenen Trägern), Lösungsmitteln (Ethanol, Methanol, Ethylacetat, THF und Mischungen) und Hydrierbedingungen (Reaktionszeit, Temperatur und Druck). Unter den optimierten Bedingungen (Platin auf Aktivkohle, Ethylacetat, 7 bar, 15 Stunden, 40 °C) konnte **301** in 84% Ausbeute erhalten werden. Unter anderen Bedingungen bzw. mit anderen Katalysatoren wurde entweder keine Reaktion beobachtet oder das Oxadiazol wurde hydriert. Die Spaltung von **301** ebenso wie die Alkylierung von **293** zu **295** verlief mit quantitativen Ausbeuten. Der Methylester **295** konnte in 80% Ausbeute zu **ST-1436 (297)** gespalten werden. **ST-1436 (297)** wurde in sechs Schritten in einer Gesamtausbeute von 48% synthetisiert.



Schema 29: Synthese von **ST-1436 (297)** über Ringschluss und anschließende Heck-Reaktion: i) $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, Na_2CO_3 , EtOH, 3 h, Reflux; ii) **192**, EDC, $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$, abs. DMF, 30 min, RT, dann **298**, abs. DMF, 20 min, 170 °C, μw ; iii) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{P}(\text{o-Tolyl})_3$, NEt_3 , 5 h, 110 °C; iv) H_2 , 7 bar, Pt/charcoal, abs. Ethylacetat, 15 h, 40 °C; v) BBr_3 , abs. DCM, 18 h, 0 °C \rightarrow RT; vi) $\text{Br}-(\text{CH}_2)_2-\text{Br}$; Cs_2CO_3 , abs. DMF, 18 h, 80 °C; vii) **236**, abs. DMF, 18 h, 80 °C; viii) HOAc , HCl (5:1), 1.5 h, 90 °C.

Als weiteres fluoreszenzmarkiertes, potenziell S1P_1 -selektives Oxadiazol mit polarer Kopfgruppe wurde ein Propanhydroxamsäurederivat synthetisiert. Die direkte Synthese von **ST-1455 (302)** aus dem Methyl ester **295** durch Umsetzung mit wässriger Hydroxylamin-Lösung und katalytischen Mengen Kaliumcyanid^[321] bzw. die Umsetzung mit wässriger Hydroxylamin-Lösung in der Mikrowelle war nicht erfolgreich. Stattdessen wurde die Säure **ST-1436 (297)** zunächst mit Ethylchloroformat in das gemischte Anhydrid überführt und anschließend mit wässriger Hydroxylamin-Lösung zu **ST-1455 (302)** umgesetzt.^[322]

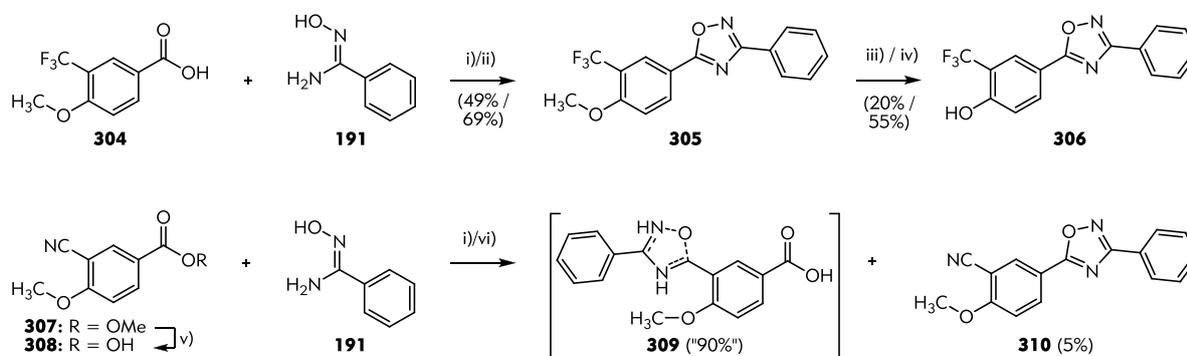


Schema 30: Synthese von 3-(4-(5-(4-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)-N-hydroxypropanamid, **ST-1455 (302)**: i) H_2NOH (aq. 50%), KCN, THF:MeOH (1:1), 12h/12h/12h, RT/40 °C/Reflux; ii) H_2NOH (aq. 50%), THF:MeOH (1:1), 15 min, 80 °C, μw ; iii) Ethylchloroformat, NEt_3 , abs. DMF, 1 h, 0 °C; iv) H_2NOH (aqua. 50%), 50 min, RT.

4.1.2.9 Fluoreszenzmarkierte 5-(3'-substituierte Aryl)-3-Aryl-oxadiazole

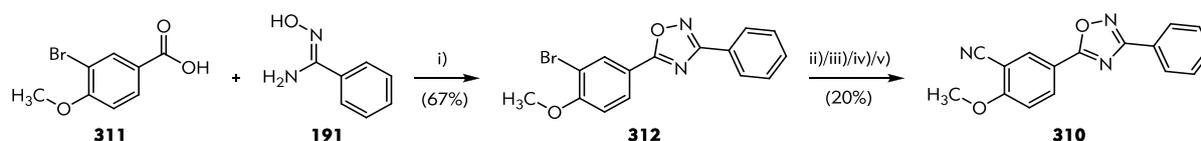
Die Synthese der an 3-Position des 5-Phenylrings substituierten Diaryloxadiazole wurde in analoger Weise zu den Synthesen der unsubstituierten geplant. Die entsprechenden substituierten Carbonsäuren **304** bzw. **308**, die mit Lithiumhydroxid aus dem Ester **307** freigesetzt wurde,^[323] wurden mit EDC und HOBT aktiviert^[273] und anschließen in der Mikrowelle mit dem N' -Hydroxybenzamidin (**191**) umgesetzt (Schema 31). Das Trifluormethylderivat **305** konnte in mäßiger Ausbeute (49%) erhalten werden, wohingegen die Umsetzung von **308** zu nur ca. 5% das Oxadiazol **310** neben ca. 70% eines nicht eindeutig identifizierten Reaktionsprodukts (**309**) am aromatischen Nitril lieferte. Auch durch Variation der Reaktionsbedingungen (längeren Reaktionszeit bis zu 3 Stunden) und durch Zusatz von katalytischen Mengen Tetrabutylammoniumfluorid^[324] konnte **310** nicht erhalten; die Ausbeute an **309** stieg nur auf 90%.

Unterdessen konnte die Ausbeute des Ringschlusses zum Trifluormethylderivat **305** durch Verwendung von THF als Lösungsmittel und längeren Mikrowellenreaktionszeit (3 Stunden) um 20% gesteigert werden (69%). Die Etherspaltung zu **306** mit Bortribromid lieferte das Phenol **306** in nur 20% Ausbeute, wobei 60% **305** re-isoliert werden konnten. Auch die Etherspaltung durch Lithiumchlorid in DMF unter Mikrowellenbestrahlung^[325] lieferte nur 55% des Phenols **306** neben zahlreichen Zersetzungsprodukten.



Schema 31: Syntheseweg zu 5-(4-Methoxy-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol, **305** und 2-Methoxy-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril, **310**: i): a) **304/308**, EDC, HOBT*H₂O, abs. DMF, 15 min, RT, b) **191**, abs. DMF, 30 min 180 °C, μw ; ii): a) **304**, EDC, HOBT*H₂O, abs. THF, 15 min, RT, b) **191**, abs. THF, 3 h, 170 °C, μw ; iii) BBr₃, abs. DCM, 18 h, -30 °C --> RT; iv) 3 eq LiCl, abs. DMF, 20 min, 180 °C, μw ; v) 7 eq. LiOH, THF:MeOH:H₂O (2:2:0.15), 17 h, RT; vi): a) **308**, EDC, HOBT*H₂O, abs. DMF, 0-60 min, RT, b) **191**, abs. DMF, (Bu₄NF); 30 - 240 min, 100-200 °C, μw .

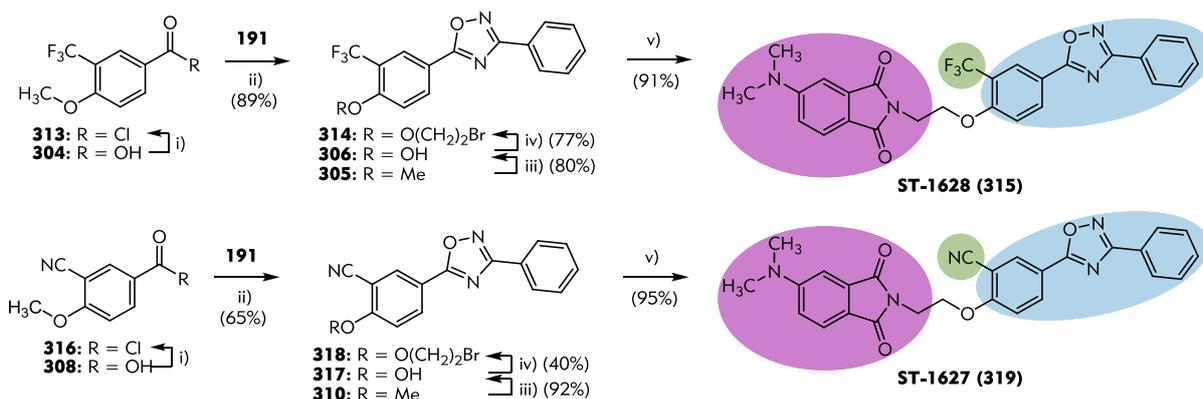
Da 2-Methoxy-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril (**310**) mittels Oxadiazolringschluss zwischen der Säure **308** und **191** nicht synthetisierbar war, wurde zunächst das Bromderivat **312** synthetisiert (Schema 32). Ähnlich wie bei der Synthese des Trifluormethylderivats **305**, konnte auch hier durch Reaktion in THF eine 20% höhere Ausbeute erzielt werden. Das Arylbromid **312** wurde verschiedenen Cyanierungsbedingungen unterzogen. Die Umsetzung mit Zink(II)cyanid und Pd(PPh₃)₄ in DMF bei 80 °C^[326] lieferte **310** in 20% Ausbeute neben 60% Edukt **312** und 10% des Phenols von **312**. Die entsprechende mikrowellenassistierte Reaktion^[327] lieferte ebenso wie die Reaktion in DMSO unter konventioneller Erhitzung keine Umsetzung. Die Reaktion mit Kupfer(I)cyanid in der Mikrowelle^[328] in DMSO oder NMP führte zur Zersetzung des Oxadiazols.



Schema 32: Synthese von 2-Methoxy-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril, **310**, durch Cyanierung: i): a) **311**, EDC, HOBT*H₂O, abs. THF, 15 min, RT, b) **191**, abs. THF, 2 h, 170 °C, μw ; ii) Zn(CN)₂, Pd(PPh₃)₄, abs. DMF, 24 h, 80 °C; iii) Zn(CN)₂, Pd(PPh₃)₄, abs. DMF, 15-30 min, 175-190 °C, μw ; iv) Zn(CN)₂, Pd(PPh₃)₄, abs. DMSO, 48 h, 95 °C; v) CuCN, abs. DMSO/NMP, 15 min, 200 °C, μw .

Elektronenarme Aromaten, wie **304**, **308** und **311** scheinen unter den bisher gewählten Bedingungen (Schema 31 und Schema 32) sehr reaktionsträge zu sein. Die in Schema 31 dargestellte Synthese des Trifluormethylanisols **306** liefert bei langen Mikrowellenreaktionszeiten nur mäßig gute Ausbeuten und erfordert zudem eine säulenchromatographische Aufreinigung. Ebenso stellt die Synthese des Cyanoanisols **310** durch Cyanierung keinen brauchbaren Syntheseweg dar. Aus diesem Grund wurde in beiden Fällen ein klassischer Syntheseweg zum Oxadiazol gewählt: Refluxieren des Säurechlorid und der *N'*-Hydroxybenzamidins in Pyridin.^[272,329]

Die Säure **304** und **316** wurden jeweils das Säurechlorid **313** bzw. **316** überführt, welche mit **191** in einer Mischung aus Toluol und Pyridin zum Sieden erhitzt wurde.^[329] Die entsprechenden Oxadiazole **305** und **310** konnten in 89% bzw. 65% Ausbeute erhalten werden. Da die Spaltung des aromatischen Methylethers im Falle von **305** nur mäßig guten Umsatz lieferte, wurden **305** und **310** nun durch Reaktion in einer Schmelze aus Pyridiniumhydrochlorid in die beiden Phenole **306** und **317** überführt.^[330] Anschließend wurden die Phenole mit Dibromethan alkyliert (**314** und **318**) und mit Kalium 4-DMAP (**236**) zu den entsprechenden fluoreszenzmarkierten, 5,3' substituierten Diaryloxadiazolen **ST-1628** (**315**) und **ST-1627** (**319**) umgesetzt.



Schema 33: Synthese von 5-(Dimethylamino)-2-(2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-2-(trifluormethyl)phenoxy)ethyl)isoindolin-1,3-dion, **ST-1628** (**315**), und 2-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril, **ST-1627** (**319**): i) SOCl_2 , abs. Toluol, 6 h, Reflux, ii) abs. Py, abs. Toluol (1:1), 20 h, Reflux iii) $\text{Py}\cdot\text{HCl}$, 1.5 h, Schmelze (210 °C); iv) $\text{Br}-(\text{CH}_2)_2-\text{Br}$, Cs_2CO_3 , abs. DMF, 18 h, 80 °C; v) **236**, abs. DMF, 18 h, 80 °C.

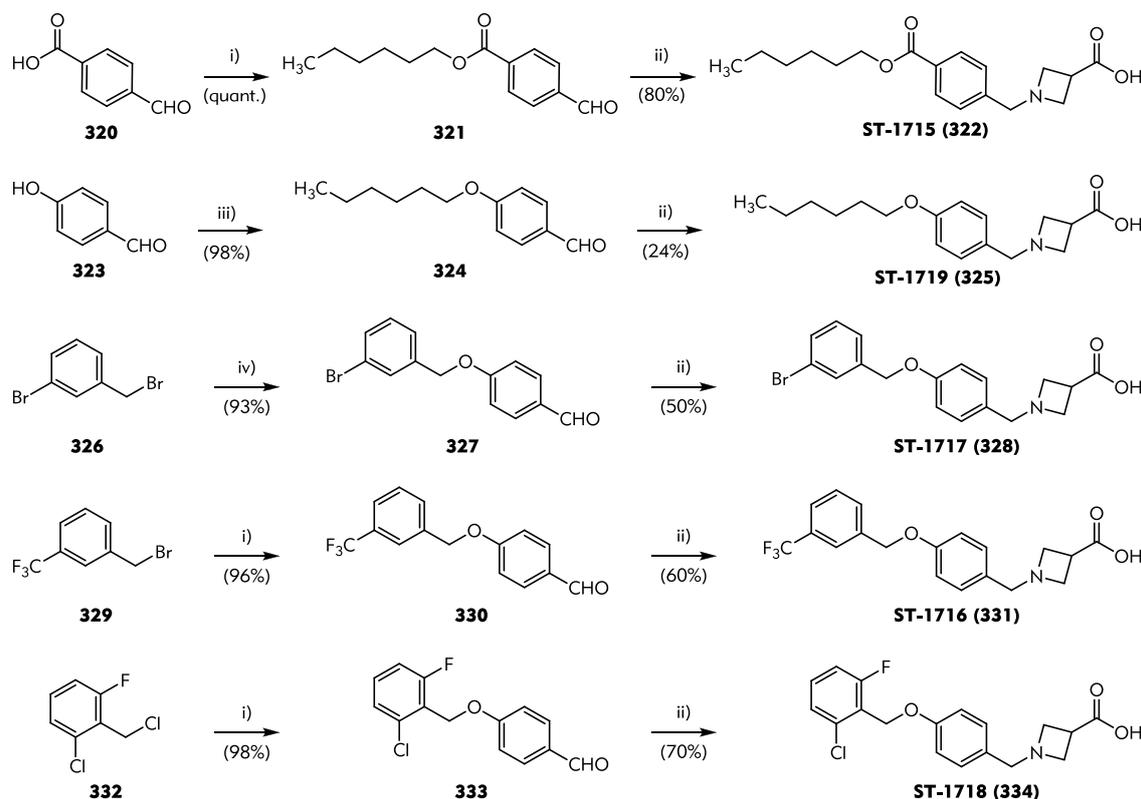
Die Bestimmung des Bindungsverhalten bzw. der Aktivität der neuen fluoreszenzmarkierten, Diaryloxadiazol-basierten S1P₁-Liganden mit polarer Kopfgruppe bzw. mit einem zusätzlichen Substituent an der 3-Position der 5-Phenylring am S1P₁-Rezeptor steht bisher noch aus.

Da die synthetisierten pharmakologischen Tools noch nicht weiter in biologischen Systemen auf ihr Verhalten an S1P-Rezeptoren getestet werden konnten, konnte bisher keine weitere Optimierung durchgeführt werden.

4.1.2.10 Liganden für S1P₅-Rezeptor

Im Laufe der Arbeiten am Sphingolipidthema wurden unter anderem einige Referenzsubstanzen von Patentliteratur bekannten^[331], S1P₅-selektiven Liganden vom Benzylazetidin-3-carbonsäuretyp hergestellt.

Die in Schema 34 gezeigten, als hoch-potente, S1P₅-selektive Liganden beschriebenen^[331] Verbindungen **ST-1715** - **ST-1719** wurden durch reduktive Aminierung des entsprechenden Benzaldehyds mit Azetidin-3-carbonsäure erhalten. Die Aldehyde wurden dabei durch Veresterung^[332] (**321**) bzw. durch Alkylierung^[333] (**324**, **327**, **330**, **333**) von 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) erhalten. Als Reduktionsmittel im letzten Schritt der Synthesen wurde Natriumtriacetoxyborhydrid statt des in der Literatur^[331] beschriebenen festphasengebundenem Natriumcyanoborhydrid verwendet. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisation statt durch präparativer HPLC.



Schema 34: Synthese von **ST-1715 (322)**, **ST-1719 (325)**, **ST-1717 (328)**, **ST-1716 (331)** und **ST-1718 (334)**: i) K_2CO_3 , $\text{Br}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$, abs. DMF, 22-25 h, 60-80 °C, Ar; ii) a) Azetidin-3-carbonsäure, HOAc, abs. DCE, 30 min, RT, Ar, b) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 14-23 h, RT; iii) a) K_2CO_3 , abs. MeCN, 80 °C, b) $\text{Br}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$, 40 h 80 °C; iv) **323**, K_2CO_3 , abs. EtOH, 18 + 7 h, RT \rightarrow 60 °C.

4.2 5-Lipoxygenase (5-LO)

4.2.1 Konzept

Die beiden bisher im Arbeitskreis durchgeführten Studien^[225,249] zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) der Aryliden-Aryl-Thiazolone zeigten, dass sie, wie andere LO-Inhibitoren eine kontinuierliche SAR aufweisen.^[251] Verschiedene Ether-, Amid- oder Halogenidsubstituenten an den beiden Arylringen, sowie große, lipophile Systeme werden von der 5-LO Bindungsstelle generell gut akzeptiert. Um die SAR der Aryliden-Aryl-Thiazolone zu erweitern und um die Löslichkeit der Verbindungen zu steigern, wurden einige polarere Derivate mit unterschiedlichen elektronischen Strukturen und Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften synthetisiert. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden zum einen Morpholinderivate synthetisiert, da sie viele Autoren^{z.B.[334,335]} als besser wasserlöslich beschreiben. Zum anderen wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Heteroaromaten-Bausteine anhand der clogP-Werte der Aryliden-Aryl-Thiazolone ausgewählt und diese hergestellt. Der clogP-Wert der Hetero-Aryliden-Aryl-Thiazolone lag dabei unter dem von **C06 (182)**.

Es zeigte sich allerdings, dass Inhibitoren mit einer größeren Polarität bzw. besserer Wasserlöslichkeit nur noch eine eingeschränkte Aktivität an der 5-LO aufweisen. Daher wurde der Fokus der Arbeit auf die Veränderung des Thiazolongrundgerüsts und die Charakterisierung der Bindungsstelle der Aryliden-Aryl-Thiazolone verschoben. Um die vermutlich allosterische Bindungsstelle der Aryliden-Aryl-Thiazolone^[248] charakterisieren zu können, wurde eine Reihe an Inhibitoren entwickelt, die zum kovalenten bzw. zum Photoaffinity-Labeling eingesetzt werden können, und ihre Eignung zum kovalenten Labeling untersucht.

Einzelne Elemente der Aryliden-Aryl-Thiazolongrundstruktur bzw. des Thiazolonkerns wurden ausgetauscht, um bessere Einblicke in die SAR zu erlangen und mit einem Scaffold Hopping eine neue Strukturklasse an 5-LO-Inhibitoren zu erschließen.

Die verschiedenen Inhibitorgruppen sind in Abbildung 51 schematisch dargestellt.

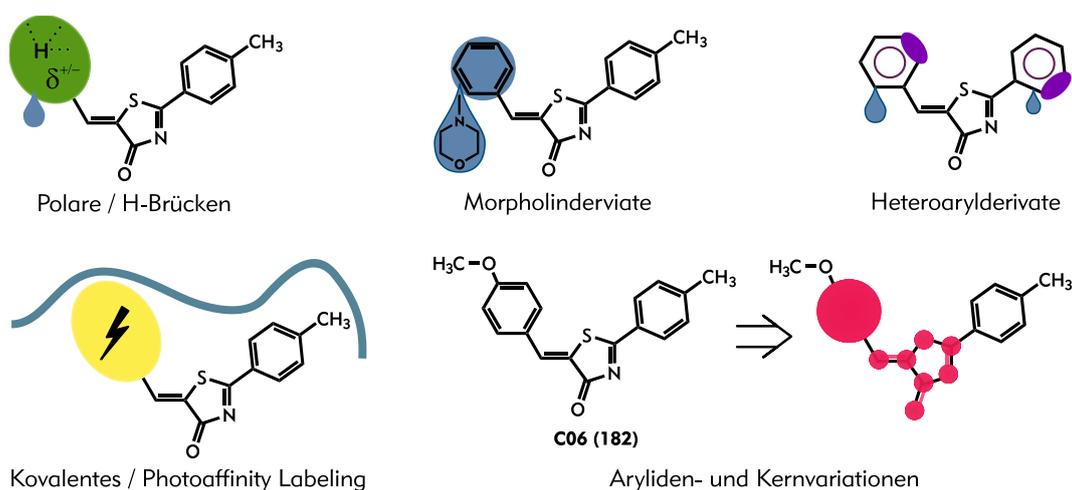
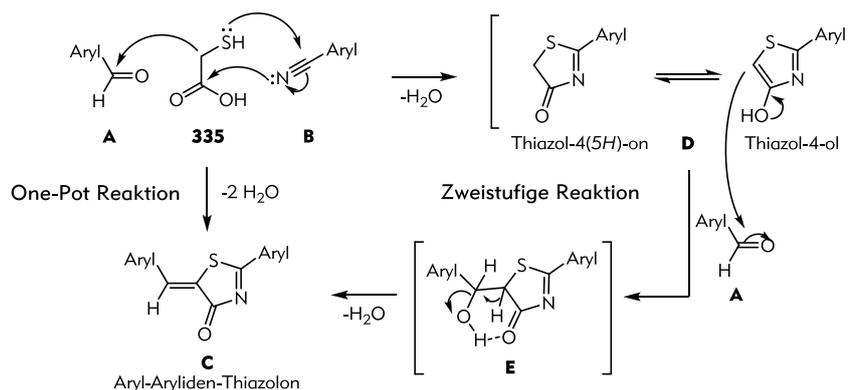


Abbildung 51: Zielmolekülstrukturgruppen; die Tropfen sollen eine verbesserte Löslichkeit im Wässrigen andeuten; lila = Heteroatome; rot = veränderte Elemente.

4.2.2. Synthesen

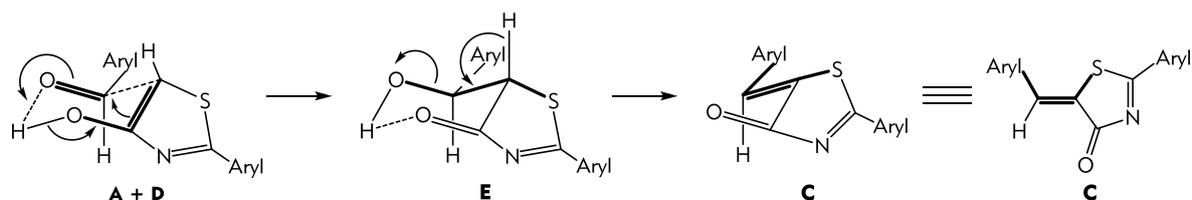
4.2.2.1 Allgemeine Synthese der Aryliden-Aryl-Thiazolone

Die Aryliden-Aryl-Thiazolone (**C**) (Schema 35) können nach Zayed *et al.*^[336] in einer Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion zwischen einem aromatischen Aldehyd (**A**), einem aromatischen Nitril (**B**) und Thioglykolsäure (**335**) hergestellt werden. Alternativ kann die Synthese in einer zweistufigen Synthese erfolgen. Dabei wird das aromatische Nitril zunächst mit Thioglykolsäure (**335**) zum Thiazol-4(5*H*)-on (**D**) umgesetzt^[336], welches im Gleichgewicht^[337] mit dem tautomeren Thiazol-4-ol steht. Die C-H-azide Verbindung kann, unter Basenkatalyse, Aldol-artig mit einem aromatischen Aldehyd (**A**) über das Intermediat **E** zum Aryliden-Aryl-Thiazolon (**C**) kondensiert werden.^[338]



Schema 35: Mechanismus der Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion bzw. der zweistufigen Reaktion über das Thiazol-4(5*H*)-on (**D**) zum Aryliden-Aryl-Thiazolone (**C**).

Anhand der Röntgenkristallstruktur^[225] von **C06** (**182**) konnte bewiesen werden, dass die Doppelbindung (*Z*)-konfiguriert ist. Die Bildung der (*Z*)-konfigurierten Doppelbindung lässt sich durch den Reaktionsmechanismus erklären (Schema 36). Bei der Annäherung des Aldehyds **A** an die Enolform von **D** ordnet sich der Arylrest von **A** so an, dass er im sechsgliedrigen Übergangszustand **A+D** eine pseudoequatoriale Position einnimmt. Die Carbonylgruppe des Thiazolons bildet im Intermediat **E** mit der OH-Gruppe des ehemaligen Aldehyds eine Wasserstoffbrückenbindung aus. In diesem sechsgliedrigen Ring sind sowohl der Arylrest als auch der Fünfring pseudoequatorial angeordnet. Dadurch sind der Schwefel und der Sauerstoff der OH-Gruppe *trans* zueinander angeordnet und die Eliminierung des axialstehenden Wasserstoffs am Thiazolon resultiert in einer (*Z*) konfigurierten Doppelbindung im Aryliden-Aryl-Thiazolon **C**. Aufgrund des gleichen Reaktionsmechanismus ist davon auszugehen, dass alle anderen Aryliden-Aryl-Thiazolone ebenfalls eine (*Z*)-Konfiguration aufweisen, da sowohl die Kondensation zwischen **D** und einem aromatischen Aldehyd **A**, als auch die Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion über das Intermediat **E** verlaufen.



Schema 36: Zimmermann-Traxler ähnliches Modell der Kondensation zwischen der Enolform von Thiazol-4(5*H*)-on, **D**, und einem aromatischen Aldehyd **A** zum (*Z*)-konfiguriertem Aryliden-Aryl-Thiazolon **C**.

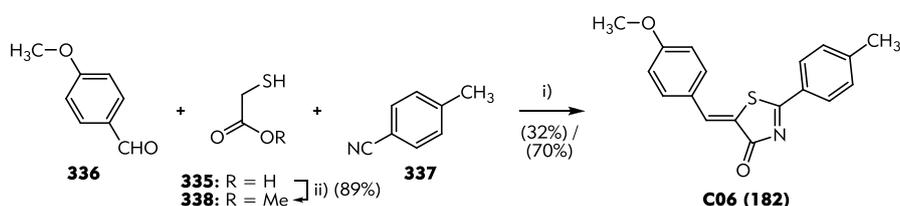
Durch die chemische Verschiebung des Doppelbindungsprotons sind, ohne Fernkopplungsmuster, keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Konfiguration möglich.

Zur literaturbekannten Synthese der Aryliden-Aryl-Thiazolone über die one-pot-Reaktion wird eine Mischung aus jeweils einem Equivalent jeder Komponente in Ethanol mit 1.0 - 1.5 Equivalenten Triethylamin für 1-12 Stunden zum Sieden erhitzt.^[225,249,336] Das Aryliden-Aryl-Thiazolon kann durch Umkristallisation mit einer Ausbeute von maximal 45%, meist jedoch um die 20%, isoliert werden. Die Thiazol-4(5*H*)-one, **D**, werden durch einstündiges Erhitzen von je einem Equivalent Nitril, Thioglykolsäure und Triethylamin in Ethanol erhalten. Die Aufreinigung erfolgt ebenfalls durch Umkristallisation und liefert maximale Ausbeuten von 30%, wohingegen die Kondensation in Toluol mit Ammoniumacetat als Base mit bis zu 60% Ausbeute durchführbar ist.^[225,249,339]

Da diese beiden Reaktionen den Hauptsyntheseweg zu Aryliden-Aryl-Thiazolonen darstellen, wurden sie eingehend untersucht und optimiert. Die Ausbeute der Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion wird durch Variation der Reaktionszeit nicht beeinflusst, noch ist sie bei säulenchromatographischer Aufreinigung höher als bei Aufreinigung durch Kristallisation.^[340]

Mikrowellensynthese stellt durch den schnelleren, direkten Energieeintrag eine effizientere Synthesemethode dar. Die Energie wird direkt in die Reaktanten eingetragen, wodurch die Reaktionstemperatur rasch erreicht wird und die Aktivierungsenergiebarriere schnell überwunden werden kann. Durch das geschlossene System kann außerdem unter Druck gearbeitet werden und es können Temperaturen über dem Siedepunkt der Komponenten bzw. Lösungsmittel unter Normalbedingungen erreicht werden. Neben der Zeitersparnis führt die kürzere Reaktionszeit meist auch dazu, dass die Reaktionen sauber ablaufen bzw. das weniger Nebenprodukte gebildet werden, weshalb die Aufreinigung vereinfacht wird.^[341] Daher wurden für die Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion und die zweistufige Synthese mikrowellenassistierte Synthesen etabliert.

Zur Synthese von **C06** ((*Z*)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-*p*-tolylthiazol-4(5*H*)-on, **182**) wurde eine Mischung aus je einem Equivalent 4-Methoxybenzaldehyd (**336**), Thioglykolsäure (**335**) und *p*-Tolunitril (**337**) in Triethylamin für 15 Minuten in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt (Schema 37). Durch Umkristallisation aus Methanol konnten 32% **182** erhalten werden.



Schema 37: Mikrowellensynthese von **C06 (182)**: i) 0.5 eq NEt₃, 15 min, 100 °C, μw ; ii) konz. H₂SO₄, abs. MeOH, 15 min, 100 °C, μw .

Dabei zeigte sich, dass die Verwendung von Lösungsmitteln oder die Verlängerung der Reaktionszeit die Ausbeute der Reaktion nicht steigern konnte. Es wird lediglich beobachtet, dass sich der Reaktionsansatz dunkler verfärbt, unangenehmer riecht und die isolierte Ausbeute sinkt. Wird statt Thioglykolsäure der reaktivere Thioglykolsäuremethylester (**338**) verwendet, kann unter gleichen Bedingungen **182** mit einer Ausbeute 70% isoliert werden. Der Methylester **338** kann aus der Säure **335** durch mikrowellenassistierte Veresterung^[342] in Methanol in 89% Ausbeute erhalten werden (vgl. ii) in Schema 37).

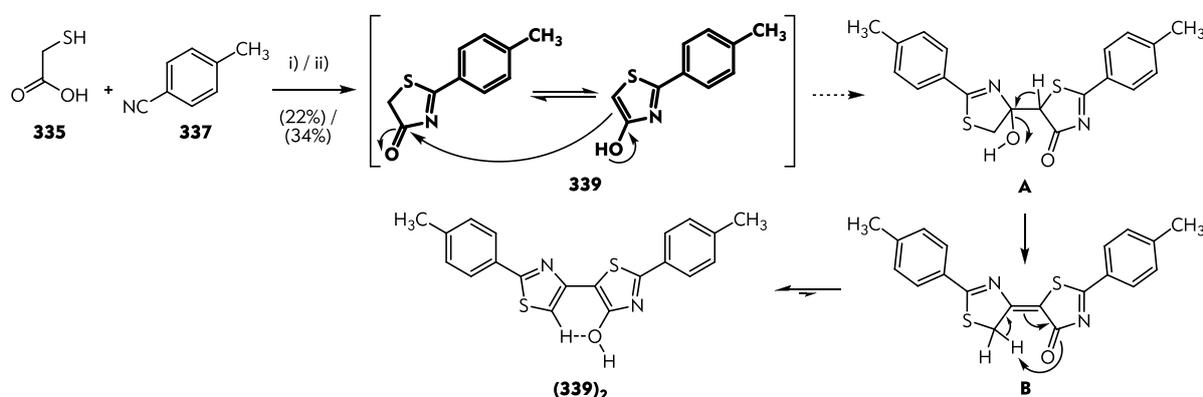
4.2.2.1 Allgemeine Synthese der Aryliden-Aryl-Thiazolone

Die Drei-Komponenten-one-pot-Mikrowellensynthese eignet sich generell zur Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen, deren Edukte preisgünstig und kommerziell verfügbar sind, da ca. 70% der Edukte nicht umgesetzt bzw. nicht wieder isoliert werden können oder zu Nebenprodukten abreagieren. Eine säulenchromatographische Aufreinigung solcher Ansätze ist aus vielerlei Gründen schwierig. Zum einen ist die Masse des Produkts aufgrund der geringen Ausbeute die kleinste des Reaktionsgemisches und zum anderen sorgt unreaktierte Thioglykolsäure dafür, dass keine ausreichende Trennung erzielt werden kann, da sie aufgrund ihrer Menge als Lösungsmittel fungiert und das Produkt in ihr „gelöst ist“. Das vorherige Entfernen der Thioglykolsäure durch Destillation (Siedepunkt 123 °C bei Normaldruck) führt zur Bildung von geruchsintensiven Zersetzungsprodukten und zu einer Verfärbung des Ansatzes.

Um diese Problem zu umgehen und zur Umsetzung von synthetisierten bzw. kostenintensiven Aldehyden, kann der zweistufige Syntheseweg gewählt werden. 2-(*p*-Tolyl)thiazol-4(5*H*)-on (**339**) wird nach Zayed *et al.*^[336] durch zweistündiges Erhitzen von äquimolaren Mengen *p*-Tolunitril (**337**) und Thioglykolsäure (**335**) mit Triethylamin in Ethanol synthetisiert (Schema 38). Nach Entfernung des Lösungsmittels scheidet sich **339** bei Lagerung bei 5 °C aus Methanol in 22%iger Ausbeute ab.

2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on liegt in Lösung als Gleichgewicht mit dem Enol 2-*p*-Tolylthiazol-4-ol vor, aus Gründen der Übersicht wird im Folgenden nur von 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) gesprochen.

Eine längere Reaktionszeit führt wie von Jensen und Crossland^[337] und Zayed *et al.*^[336] beschrieben zur Selbstkondensation von **339**. Das entstehende Aldol **A** dehydratisiert zum Enon **B**, das zum vinylogenen, aromatischen System (**339**)₂ tautomerisiert (Schema 38).



Schema 38: Syntheseweg zu 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**): i) 0.72 eq NEt₃, abs. EtOH, 2 h, Reflux; ii) 0.5 eq NEt₃, 15 min, 100 °C, μ w.

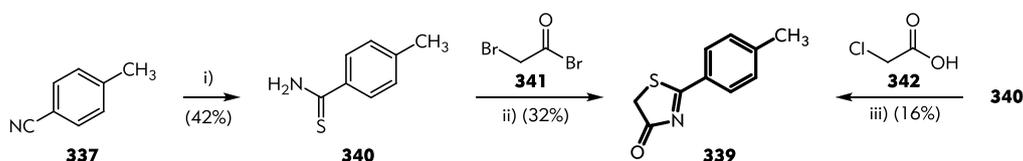
Die Durchführung der Reaktion in der Mikrowelle (je 1.0 eq **335**, **337** und 0.5 eq Triethylamin, 15 min, 100 °C) lieferte **339** in 34% Ausbeute bei gleicher Aufreinigungs- und Isolierungsmethode. Zur Optimierung der mikrowellenassistenten Synthese von 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) wurden verschiedenste Reaktionsbedingungen, Lösungsmittel, Zusätze und Aufreinigungsmethoden (Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Wasser, Wasser + Aceton), Säulenchromatographie) getestet. Einige Bedingungen sind in Tabelle 2 gezeigt.

Die Verwendung des Thioglykolsäuremethylester (**338**) statt der freien Säure **335** resultiert in einer schwarzen Reaktionsmischung, aus der **339** nur mit einer Ausbeute von 14% isoliert werden kann (1 eq NEt₃, 15 min, 100 °C). Die erhöhte Reaktivität scheint hier nicht vor Vorteil zu sein.

Tabelle 2: Bedingungen zur mikrowellenassistenten Synthese von **339** (je ein Äquivalent **337** und **335**)

	Lösungsmittel	Zeit [min]	Temperatur	Aufreinigung / Isolierung	Ausbeute
0.5 eq NEt ₃	-	15	100 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus MeOH	34 %
1.0 eq NEt ₃	-	25	100 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus EtOH	23 %
1.0 eq NEt ₃	H ₃ COH	15	100 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus MeOH	21 %
1.0 eq NEt ₃	H ₃ COH	25	100 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus EtOH	18 %
1.0 eq NEt ₃	H ₃ COH	15	90 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus MeOH	16 %
1.0 eq NEt ₃	H ₃ COH	15	120 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus MeOH	14 %
1.0 eq NEt ₃	H ₅ C ₂ OH	30	100 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus EtOH	5 %
1.0 eq TFA	H ₃ COH	15	100 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus MeOH	0 %
1.0 eq Pyridin	-	15	100 °C	Lösungsmittel entfernen, Umkristallisieren aus MeOH	0 %
-	Ionische Flüssigkeit (Hexylmethylimidazoliumbromid)	15	100 °C	Extraktion mit DCM, Umkristallisieren aus MeOH	0 %
0.8 eq NEt ₃	Ionische Flüssigkeit (Hexylmethylimidazoliumbromid)	15	100 °C	Extraktion mit DCM, Umkristallisieren aus MeOH	15 %

Außer durch Kondensation des Nitrils **337** mit Thioglykolsäure (**335**) bzw. dem Methylester **338** wurde **339** auch ausgehend vom Thioamid **340** hergestellt (Schema 39). Verbindung **340** wurde durch eine mikrowellenassistierte Reaktion zwischen **337** und einer wässrigen Ammoniumsulfid-Lösung in 43%iger Ausbeute erhalten.^[343] 4-Methylbenzothioamid (**340**) wurde in einer Zweiphasen-Reaktion in Dichlormethan und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung in 32%iger Ausbeute mit Bromacetyl bromid (**341**) zu **339** umgesetzt.^[344] Durch Schmelzen von **340** mit Chloressigsäure (**342**)^[337] konnte **339**, neben dem Kondensationsdimer, dass durch Kristallisation nicht abtrennbar war, ebenfalls erhalten werden (16%).



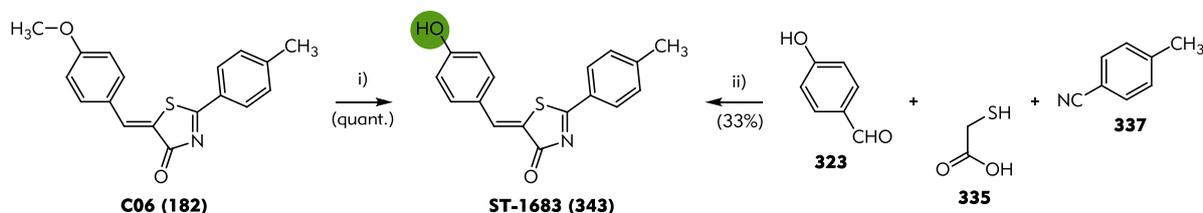
Schema 39: Alternative Synthesewege zu 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**): i) aq. 40% S(NH₄)₂, abs. MeOH, 25 min, 80 °C, μw ; ii) DCM, ges. NaHCO₃ (2:1), 18 h, RT; iii) 15 min, Schmelze (210 °C).

Die verschiedenen Syntheseansätze und Reaktionsbedingungen der Mikrowellensynthese zeigten, dass **339** am praktikabelsten durch Mikrowellensynthese wie in Schema 38 (Bedingung ii)) angegeben synthetisiert werden kann. Eine Steigerung der Ausbeute über 34% war nicht möglich. Zur Aufreinigung und Isolierung wird das Triethylamin im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Methanol versetzt und für 3-4 Tage bei 5 °C aufbewahrt. Nachdem nach ca. einem Tag abgeschiedenes Produkt abgetrennt wurde, kann aus der Mutterlauge durch Lagerung bei 5 °C weiteres Produkt erhalten werden. Alle Versuche **339** auf andere Weise zu isolieren bzw. Kristallisation aus anderen Lösungsmitteln, waren nicht erfolgreich bzw. nicht erfolgreicher als die beschriebene Methode.

Die Kondensation von 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) zu den entsprechenden Aryliden-Aryl-Thiazolonen erfolgte in Methanol mit katalytischen Mengen Piperidin ^{nach [345]} in einer mikrowellenassistenten Synthese bei 100 °C für 3 bis 20 Minuten.

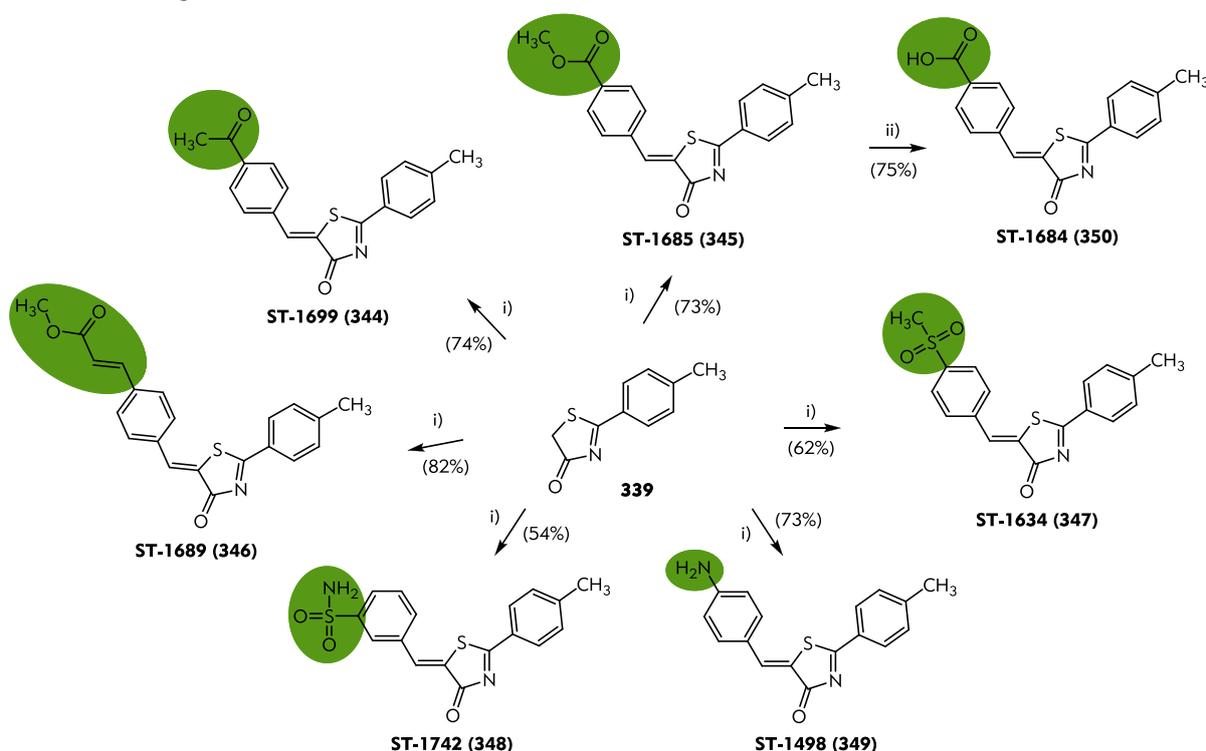
4.2.2.2 Polare Aryliden-Aryl-Thiazolone mit unterschiedlichen elektronischen und Wasserstoffbrückenbindungs-Eigenschaften

Das einfachste **C06** Analogon mit polarerer Struktur ist das entsprechende Phenol, (Z)-5-(4-Hydroxybenzyliden)-2-*p*-tolylthiazol-4(5*H*)-on, **ST-1683 (343)**. Es wurde zum einen aus **C06 (182)** durch lewisaurer Spaltung des Methylethers mit Bortribromid^[272] in quantitativer Ausbeute erhalten (Schema 40) und zum anderen durch eine mikrowellenassistierte Drei-Komponenten-Reaktion zwischen 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**), Thioglykolsäure (**335**) und *p*-Tolylnitril (**337**) (33%).



Schema 40: Synthese von (Z)-5-(4-Hydroxybenzyliden)-2-*p*-tolylthiazol-4(5*H*)-on, **ST-1683 (343)**: i) BBr_3 , abs. DCM, 4 h, $-20\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$; ii) 0.84 eq NEt_3 , 30 min, $100\text{ }^\circ\text{C}$, μw .

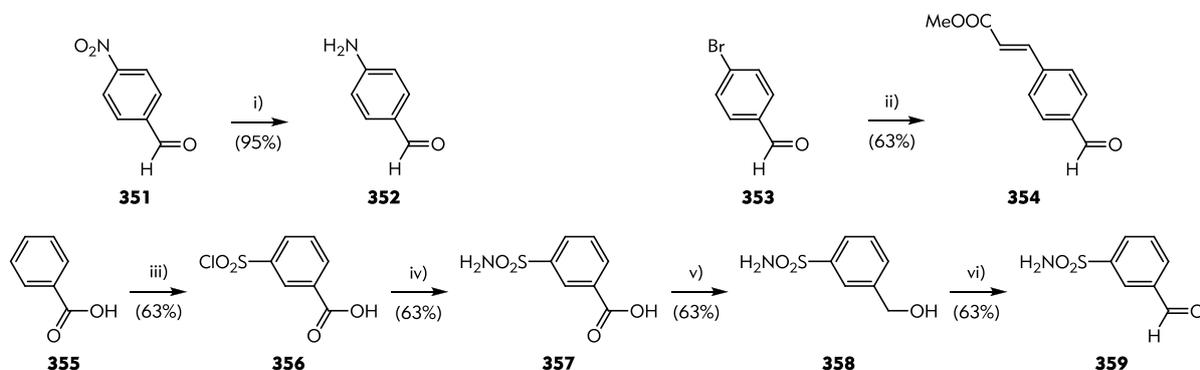
Weitere polare Derivate mit unterschiedlichen elektronischen und Wasserstoffbrückenbindungs-eigenschaften wurden über die Zweischnitt-Synthese hergestellt (Schema 41). Die entsprechenden Aldehyde wurden mit 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) in einer mikrowellenassistierten Kondensation in Ausbeuten zwischen 54 und 82% zu **344** bis **349** erhalten. **ST-1684 (350)** wurde aus dem Methylester **ST-1685 (345)** durch Hydrolyse des Esters mit einer Essigsäure-Salzsäuremischung^[318] erhalten.



Schema 41: Synthese von **ST-1699 (344)**, **ST-1685 (345)**, **ST-1689 (346)**, **ST-1634 (347)**, **ST-1742 (348)**, **ST-1498 (349)** und **ST-1684 (350)**: i) Piperidin, abs. MeOH, 3-20 min, $90\text{--}100\text{ }^\circ\text{C}$, μw ; ii) HOAc, konz. HCl (7:1), 2 h, $90\text{ }^\circ\text{C}$, verschlossenes Vial.

Die Aldehyde zur Synthese von **ST-1689 (346)**, **ST-1742 (348)** und **ST-1498 (349)** sind nicht kommerziell verfügbar und wurden wie in Schema 42 gezeigt synthetisiert. 4-Aminobenzaldehyd (**352**) wurde durch Reduktion mit Zinnchlorid^[346] aus 4-Nitrobenzaldehyd (**352**) in sehr guten

Ausbeuten erhalten. Durch eine mikrowellenassistierte Heck-Reaktion zwischen dem Bromid **353** und Methylacrylat konnte der Aldehyd **354** hergestellt werden (Mechanismus vgl. Schema 27).^[347] 3-Formylbenzolsulfonamid (**359**) wurde ausgehend von Benzoesäure (**355**) synthetisiert. Chlorsulfonierung^[348] von **355** lieferte **356**, dass mit Ammoniak in das Sulfonamid **357** überführt wurde^[349]. Verbindung **357** wurde mit Boran-THF zum Alkohol **358** reduziert^[350] und anschließend mit Mangan-VI-oxid in guten Ausbeuten zum Aldehyd **359** oxidiert^[351].

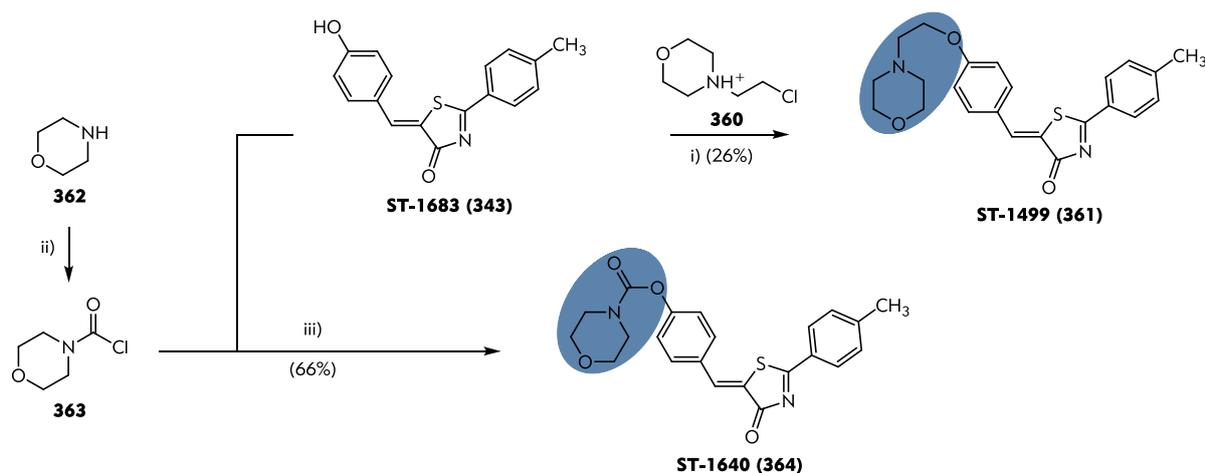


Schema 42: Synthese von 4-Aminobenzaldehyd, **352**, (*E*)-3-(4-Formylphenyl)acrylsäuremethylester, **354**, und 3-Formylbenzolsulfonamid, **359**: i) SnCl₂ · 2H₂O, EtOH, 30 min, Reflux; ii) Methylacrylat, NaOAc, Pd(OAc)₂, abs. NMP, 100 min, 115 °C, μ w; iii) HSO₃Cl, 2 h, 120 °C; iv) NH₃ (aq. 25%), 2 h, RT; v) BH₃·THF, abs. THF, 4 h, 0 °C → RT; vi) MnO₂, Aceton, 1.5 h, Reflux.

4.2.2.3 Morpholin substituierte Aryliden-Aryl-Thiazolonderivate

Morpholinderivate pharmakologisch aktiver Substanzen werden von vielen Autoren^{z.B.[334,335]} als besser löslich im Wässrigen beschrieben als die entsprechenden Nicht-Morpholinderivate. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Morpholin enthaltenden C06-Derivaten synthetisiert.

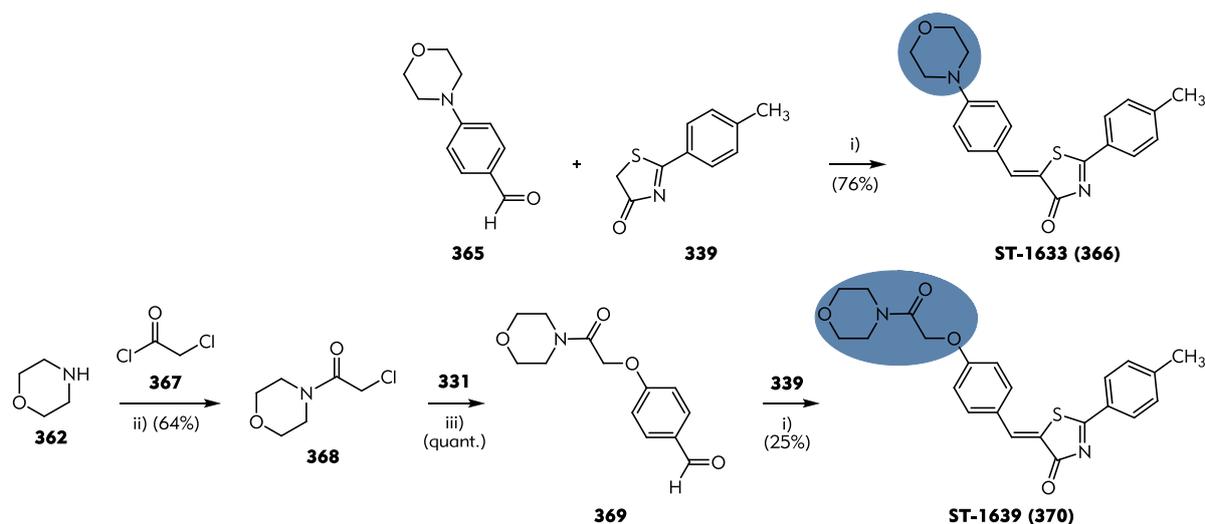
Das Phenol **ST-1683** (**343**) wurde mit Ethylchlormorpholin · Hydrochlorid, **360**, in siedendem Acetonitril zu **ST-1499** (**361**) alkyliert. Das Morpholinocarbamat **ST-1640** (**364**) wurde ebenfalls aus **ST-1683** (**343**) synthetisiert. Morpholin (**362**) wurde durch Behandlung mit Triphosgen in Morpholin-4-carbonylchlorid (**363**) überführt^[352], das dann mit **343** in Pyridin^[353] umgesetzt wurde.



Schema 43: Synthese von **ST-1499** (**361**) und **ST-1640** (**364**): i) K₂CO₃, KJ, abs. MeCN, Reflux, dann **360**, abs. MeCN, 20 h, Reflux; ii) CO(OCl)₂, NEt₃, abs. DCM, 120 min, 0 °C → RT; vi) Py, 7 h, 50 °C.

Zwei weitere Derivate, **ST-1633** (**366**) und **ST-1639** (**370**), wurden durch Kondensation von 2-*p*-Tolythiazol-4(5*H*)-on (**339**) mit den Morpholinobenzaldehyden **365** und **369** erhalten (Schema 44).

4.2.2.3 Morpholin substituierte Aryliden-Aryl-Thiazolonderivate

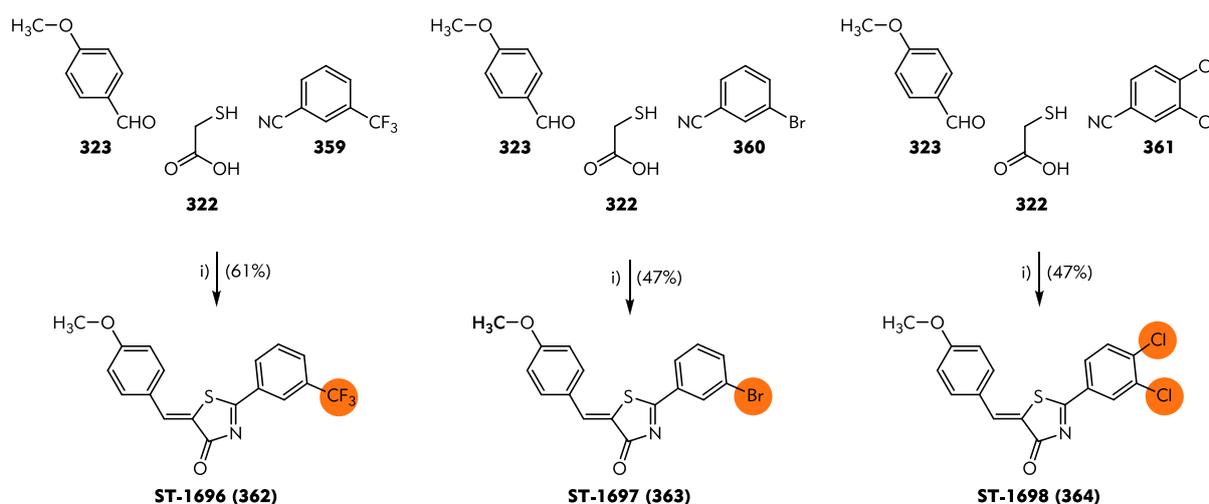


Schema 44: Synthese von **ST-1633 (366)** und **ST-1639 (370)**: i) Piperidin, abs. MeOH, 15 min, 90 °C; ii) K_2CO_3 , abs. Toluol, 2.5 h, 60 °C; iii) a) K_2CO_3 , abs. THF, Reflux, b) **368**, abs. THF, 24 h, Reflux.

ST-1633 (366), dass das Morpholin direkt am 5'-Aromaten trägt, wurde aus dem kommerziell erhältlichen 4-Morpholinbenzaldehyd (**365**) durch mikrowellenassistierte Kondensation mit **339** erhalten, ebenso **ST-1639 (370)**. Der entsprechende Aldehyd **369** wurde durch Alkylierung aus 4-Hydroxybenzaldehyd (**336**) mit **368**,^[354] dass aus Morpholin (**362**) und Chloroacetylchlorid (**367**) hergestellt wurde^[354], synthetisiert.

4.2.2.4 Halogen- und Trifluormethyl-Substituenten am 3'-Ring der Aryliden-Aryl-Thiazolone

Zur Komplettierung der halogensubstituierten **C06**-Derivate^[249] wurden die drei in Schema 45 gezeigten Derivate aus den jeweiligen Nitrilen **371**, **372** und **373** durch die Drei-Komponenten-one-pot mikrowellenassistierte Reaktion hergestellt. Die elektronenarmen und damit reaktiveren aromatischen Nitrile **371-373** liefern höhere Ausbeuten verglichen mit Reaktion des elektronenreichen Tolunitril (**337**) (vgl. Schema 37 und Schema 40).

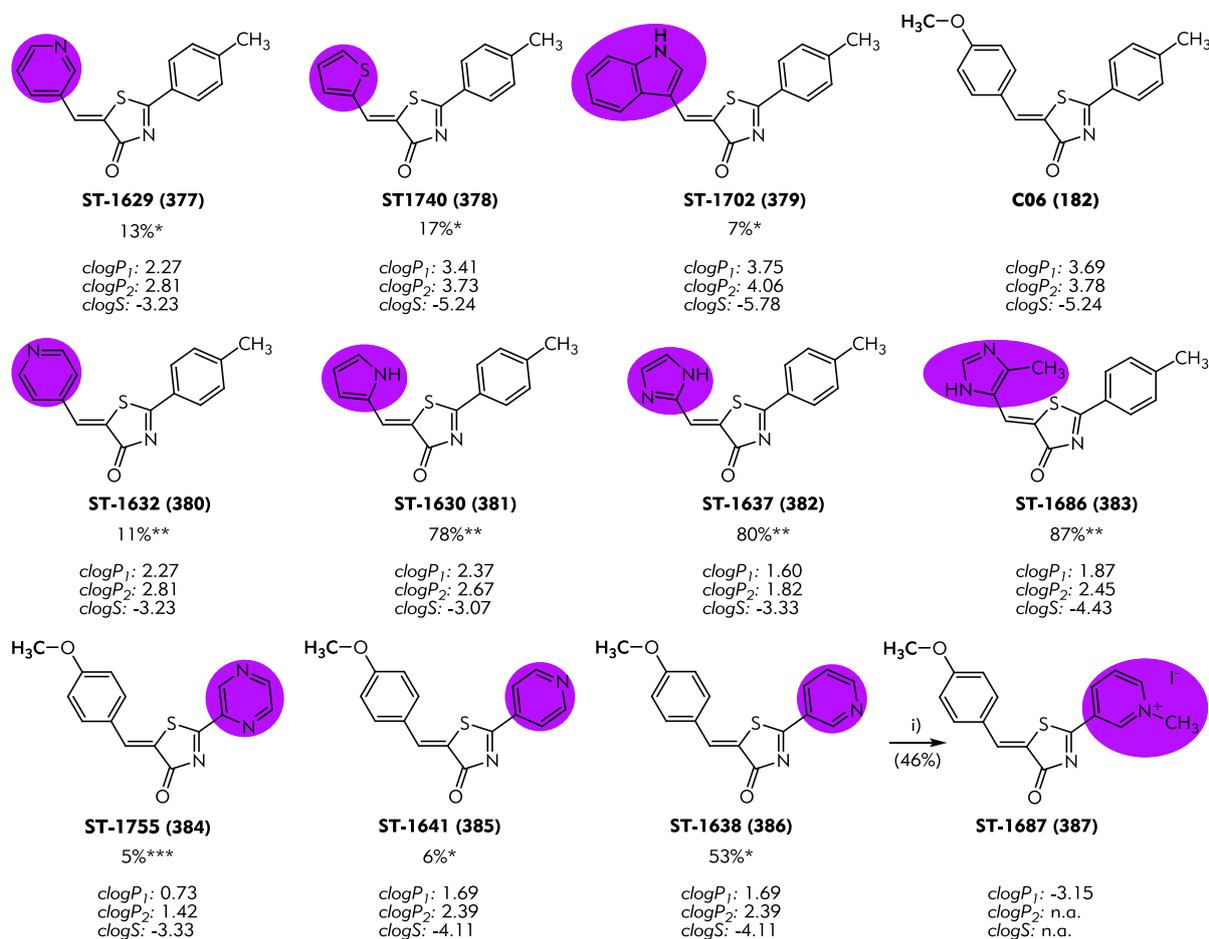


Schema 45: Synthese von **ST-1696 (374)**, **ST-1697 (375)** und **ST-1698 (376)**: i) 1.0 eq NEt_3 , 15 min, 100 °C, μw

4.2.2.5 Heteroaryliden-Aryl-Thiazolone

Der logP-Wert einer Substanz (Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen n-Octanol und Wasser) gibt Aufschluss über deren Lipophilie. Nach der „Rule of Five“ von Lipinski soll der logP-Wert unter 5 liegen, damit eine hinreichend Wahrscheinlichkeit für eine gute *In vivo*-Absorption bzw. Bioverfügbarkeit besteht. Weiterhin verlangt Lipinski nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren, nicht mehr als zehn Wasserstoffbrückenakzeptoren und ein Molekulargewicht unter 500 g/mol für eine gut bioverfügbare Verbindung. Die clogP-Werte der meisten zugelassenen Wirkstoffe liegen zwischen 1 und 3.^[355,356]

In Schema 46 sind die synthetisierten Hetero-Aryliden-Aryl-Thiazolone, mit den jeweiligen, berechneten logP-Werten (clogP₁ und clogP₂)^[356,357] sowie der berechneten Löslichkeit (clogS)^[356] dargestellt. Die jeweils verwendete Methode zur Berechnung der Werte nutzen ein atombasiertes Inkrementsystem, das den Beitrag einer unterschiedlichen Anzahl an Atomen addiert. Jede Methode wurde dabei mit verschiedenen experimentellen Daten mehrere Tausend Verbindungen trainiert und validiert.^[356,357] Außer dem Indol **ST-1702 (379)** weisen alle Verbindungen einen geringeren clogP auf und die meisten besitzen einen größeren clogS-Wert als die von **C06 (182)** auf.



Schema 46: Heteroaryliden-Aryl-Thiazolone **377** – **387**: * Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion (1.0 eq **335**, Nitril und Aldehyd, 0.7-1.0 eq NEt₃, 15-30 min, 100 °C, μw) ** Mikrowellenassistierte Kondensation mit **339** (Piperidin, abs. MeOH, 5-20 min, 90-100 °C, μw); *** **338** (1.0 NEt₃, 5 min 90 °C, μw); i) MeI, abs. DCM, 24 h, RT → 40 °C; clogP₁ berechnet mit ^[357]; clogP₂ und clogS berechnet mit ^[356]; n.b. = nicht bestimmbar.

Die meisten Variationen wurden am Arylidenrest durchgeführt, da hierbei auch die zweistufige Syntheseroute über 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) durchgeführt werden konnte (in Schema 46 mit ** gekennzeichnet). Die erhöhte Reaktivität der heteroaromatischen Nitrile, bedingt durch

die elektronenarmen Aromaten, erlaubte keine Synthese der entsprechenden Thiazol-4(5*H*)-one, da hierbei nur die entsprechenden Kondensationsdimere erhalten wurden (vgl. Schema 38). Aus diesem Grund wurden keine Di-Heteroarylidene-Aryl-Thiazolone synthetisiert. Unabhängig von den Reaktionsführungen, Lösungsmitteln, Basen und den Reaktionsbedingungen wurde bei Umsetzung der Heteroarylnitril (3-/4-Pyridin-, Pyrazin-2- und Pyrimidin-2-carbonitrile) mit Thioglykolsäure die entsprechenden Kondensationsprodukte der Thiazol-4(5*H*)-one in verschiedenen Ausbeuten isoliert (Identifizierung durch ¹H-NMR). Auch die alternative Syntheseroute über die entsprechenden Thioamide (vgl. Schema 39) führten zu den Kondensationsprodukten. **ST-1755 (384)** konnte durch die Drei-Komponenten-Reaktion mit Thioglykolsäuremethylster (**338**) erhalten werden. Die Synthese des entsprechenden Pyrimidinderivates war nicht möglich. Hier wurde lediglich 2,2'-di(Pyrimidin-2-yl)-4,5'-dithiazol-4'-ol isoliert, das wie die anderen Kondensationsprodukte der Thiazol-4(5*H*)-one in fast allen Lösungsmittel unlöslich ist (sehr geringe Löslichkeit in DMSO). Pyrimidin-2-carbonitril wies dabei eine so hohe Reaktivität auf, dass sich schon beim Mischen mit Thioglykolsäure das Kondensationsprodukt fast quantitativ bildete.

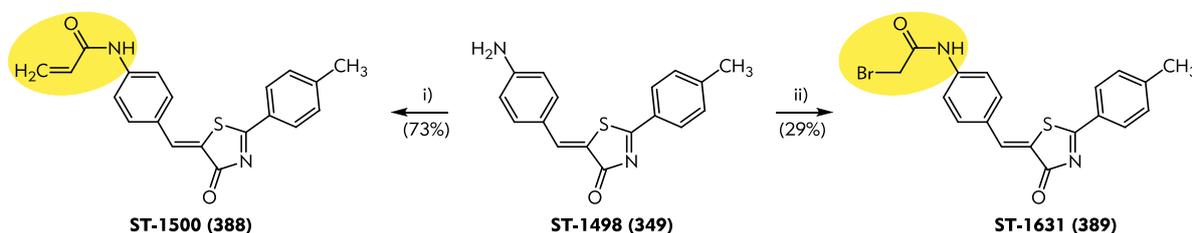
Die anderen Heteroarylidenderivate in Schema 46 wurden über die mikrowellenassistierte Drei-Komponenten-one-pot-Reaktionen oder durch Kondensation mit 2-*p*-Tolythiazol-4(5*H*)-on (**339**) synthetisiert. Die teilweise sehr geringen Ausbeuten zeigen die Schwierigkeiten der Synthese der Arylidene-Aryl-Thiazolone bzw. die der Drei-Komponenten-Synthese. Ein Hauptproblem der Synthesen lag in der Isolierung der Produkte bzw. der Abtrennung der zahlreichen Nebenprodukt und Zersetzungsprodukte der Thioglykolsäure. Die Zweischriftsyntheseroute verlief im Allgemeinen glatter, wobei auch hier sehr oft mehrfach umkristallisiert und dann säulenchromatographisch aufgereinigt werden musste.

Das Pyridiniumderivat **ST-1687 (387)** wurde durch Umsetzung von **ST-1638 (386)** mit Methyljodid erhalten.

4.2.2.6 Potentiell irreversibel bindende C06-Derivate

Parallel zu den Synthesen der C06-Derivate wurden auch die zum kovalenten Labeling fähigen C06-Derivate entwickelt und synthetisiert.

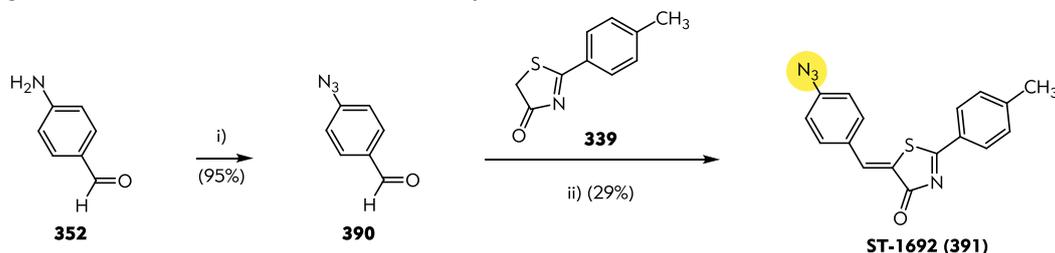
Zum kovalenten Labeling bzw. zur Reaktion mit Cysteinresten oder anderen nukleophilen Gruppen der 5-LO, wurde neben einem Acrylsäurederivat **ST-1500 (388)** auch ein Bromketonderivat **ST-1631 (389)** synthetisiert. Beiden wurde ausgehend vom Anilin **ST-1498 (389)** durch Reaktion mit Acrylsäurechlorid^[313] bzw. Bromacetyl bromid^[358,359] hergestellt.



Schema 47: Synthese von **ST-1500 (388)** und **ST-1631 (389)**: i) Acrylsäurechlorid, NEt₃, abs. MeCN, 18 h, RT; ii) Bromacetyl bromid, NEt₃, abs. DCM, 48 h, RT.

Damit Acrylsäuren und Bromketonderivate mit Thiolen bzw. nukleophilen Gruppen reagieren können, müssen sich diese ihrer unmittelbarer Umgebung befinden.^[182-184] Da dies in allosterische Bindungsstellen nicht unbedingt geben ist, wurden andere, reaktivere zum kovalenten Labeling fähige C06-Derivate synthetisiert.

Das durch Licht aktivierbare aromatische Azid **ST-1692 (391)** wurde durch Kondensation zwischen **339** und 4-Azidobenzaldehyd (**390**) hergestellt. Aufgrund der Hitzeempfindlichkeit des Azids und der hohen Reaktivität der Aldehydfunktion wurde die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Azid **390** wurde ausgehend von 4-Aminobenzaldehyd (**352**) durch Diazotierung und Substitution mit Natriumnitrit synthetisiert.^[360,361]



Schema 48: Synthese von (Z)-5-(4-Azidobenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on, **ST-1692 (391)**: i) NaNO₂, HCl, H₂O, 30 min, 0 °C, NaN₃, H₂O, 1.5 h, RT; ii) kat. NEt₃, abs. EtOH, 4.5 h, RT.

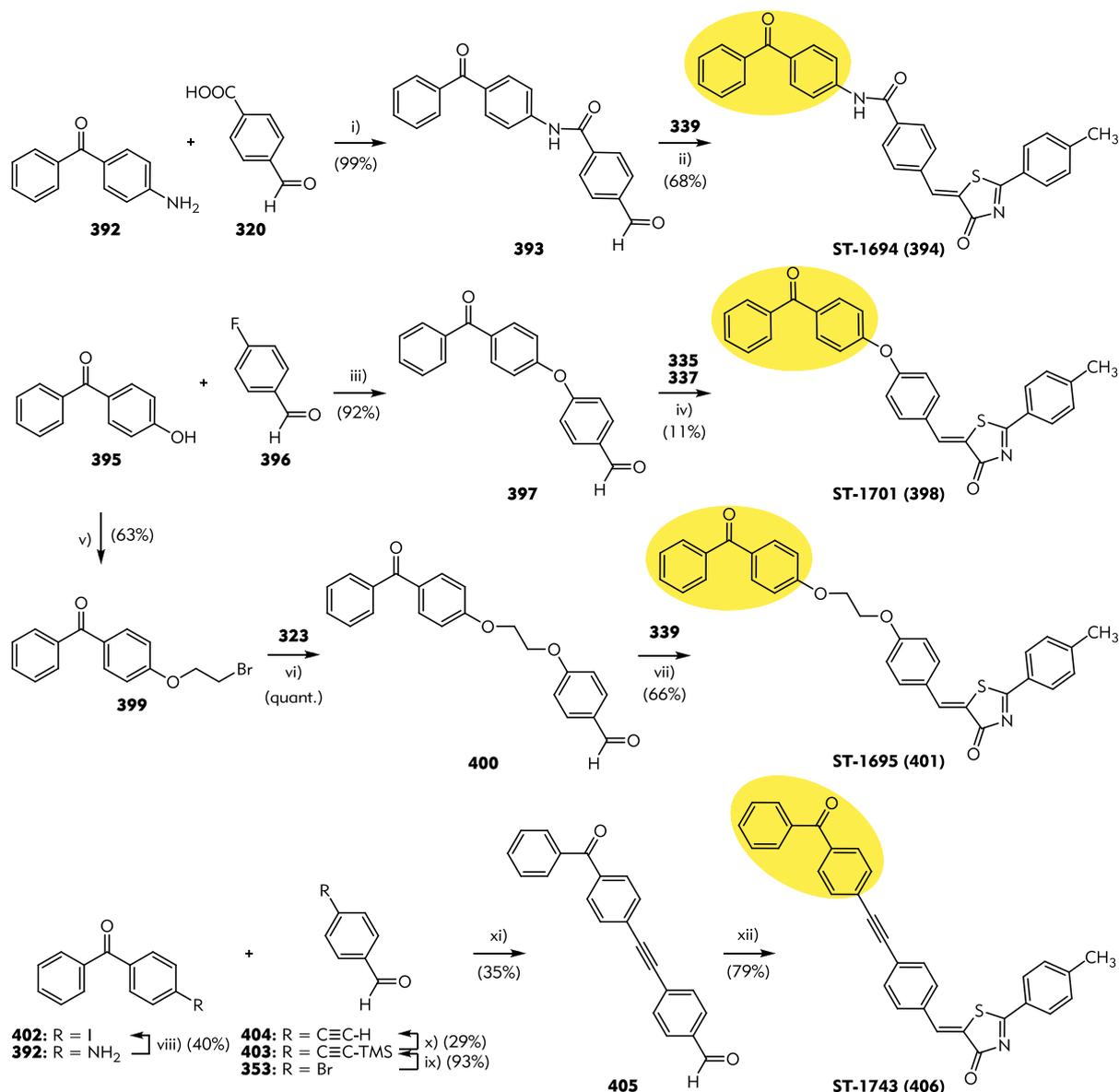
Neben dem Azid **ST-1692 (391)** wurden auch verschiedenartig verknüpfte Benzophenonderivate synthetisiert (Schema 49). Dabei wurde das Benzophenon über verschiedene Linker an das **C06**-Grundgerüst gekoppelt, da das bei Bestrahlung entstehende Radikal sonst über das gesamte Molekül delokalisiert ist und an jeder aromatischen Stelle reagieren kann. Für das amidverknüpfte Benzophenonderivat **ST-1694 (394)** wurden zunächst Aminobenzophenon (**392**) und 4-Formylbenzoesäure (**320**) durch Aktivierung mit Oxalylchlorid zu **393** gekoppelt.^[362] Der Aldehyd **393** wurde dann mikrowellenassistent mit 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) zu **ST-1694 (394)** umgesetzt.

Für das entsprechende etherverknüpfte Benzophenonderivate wurden das Phenol **395** und 4-Fluorbenzaldehyd (**396**) einer aromatischen Substitution in der Mikrowelle unterzogen.^[363,364] 4-(4-Benzoylphenoxy)benzaldehyd (**397**) wurde dann in der Drei-Komponenten-one-pot-Mikrowellenreaktion mit Thioglykolsäure (**335**) und Tolunitril (**337**) umgesetzt. Die Kondensation mit **339** lieferte ebenfalls das Produkt **398**, jedoch in noch geringeren Ausbeuten. In beiden Fällen wurde **397** zu ca. 50% re-isoliert. **ST-1701 (398)** wurde durch säulenchromatographische Aufreinigung isoliert.

Für das Derivat mit Oxyethoxy-Linker wurde das Phenol **395** in einer Phasentransferreaktion mit Dibromethan zu **399** alkyliert^[365], und quantitativ mit **336** in 4-(2-(4-Benzoylphenoxy)ethoxy)benzaldehyd (**400**) überführt^[291]. Verbindung **400** wurde dann in guter Ausbeute mit **339** zu **ST-1695 (401)** in der Mikrowelle kondensiert.

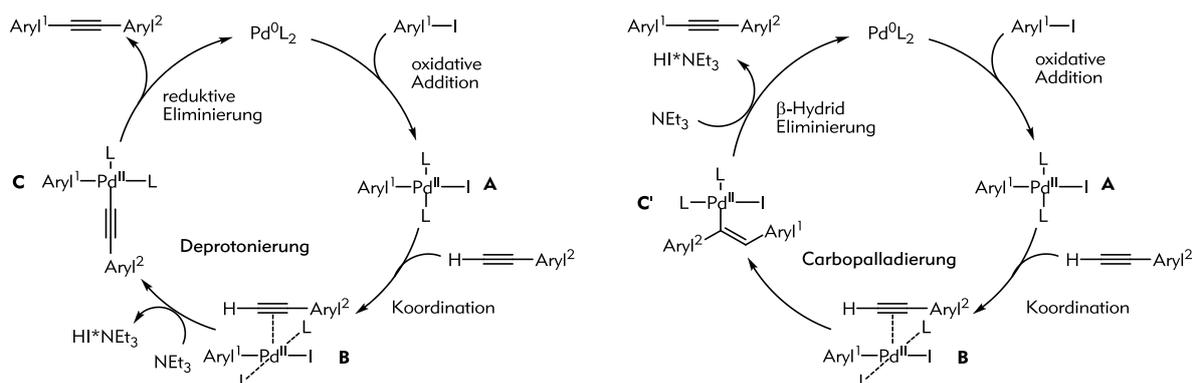
Um das Benzophenon zu rigidisieren bzw. dessen Bewegung einzuschränken, wurde das alkinverknüpfte Derivat **ST-1743 (406)** synthetisiert. Das Aryl-Alkin-Aryl-System wurde durch zweifache Sonogashira-Kreuzkupplung (Mechanismus s. Schema 50) aufgebaut. Iodbenzophenon (**402**) wurde aus dem Amin **392** hergestellt. Die Diazotierung und Substitution mit Kaliumiodid erfolgten durch intensives Mörsern aller Komponenten.^[366] 4-Ethynylbenzaldehyd (**404**) wurde ausgehend von 4-Brombenzaldehyd (**353**) hergestellt. Die Sonogashira-Kreuzkupplung zwischen **353** und Ethintrimethylsilan lieferte das TMS-geschützte Alkin **403** in sehr guten Ausbeuten^[367]. Die Abspaltung von TMS zu **404** erfolgte durch Rühren mit Kaliumcarbonat in Methanol.^[367-369] Die Palladiumkatalysierte Kupplung^[370] zwischen dem Iodid **402** und **404** lieferte den Aldehyd **405**, der dann mit **339** zu **ST-1743 (406)** kondensiert wurde.

4.2.2.6 Potentiell irreversibel bindende C06-Derivate



Schema 49: Synthese der Benzophenon C06-Derivate **ST-1694 (394)**, **ST-1701 (398)**, **ST-1695 (401)** und **ST-1743 (406)**: i) **320**, (COCl)₂, DMF, abs. THF, 50 min, RT → 40 °C, **392**, DIPEA, abs. THF, 17 h, 0 °C → RT; ii) Piperidin, abs. EtOH, 15 min, 100 °C, μw ; iii) KO^tBu, abs. DMF, 30 + 30 min, 160 °C + 180 °C, μw ; iv) NEt₃, 30 min, 100 °C, μw ; v) Br(CH₂)₂Br, NaOH, TBAB, H₂O, 21 h, Reflux; vi) Cs₂CO₃, abs. DMF, 21 h, 80 °C; vii) Piperidin, abs. MeOH, 5 min, 90 °C, μw ; viii) a) Silikaschwefelsäure, NaNO₂, mörsern, b) H₂O, 20 min, mörsern, c) KI, 10 min, mörsern; ix) TMS-C≡CH, Pd(OAc)₂, PPh₃, NEt₃, 4 h, Reflux, verschlossenes Vial; x) K₂CO₃, abs. MeOH, 1.5 h, RT; xi) Pd(OAc)₂, PPh₃, NEt₃, 4 h, Reflux, verschlossenes Vial; xii) Piperidin, abs. MeOH, 10 min, 100 °C, μw .

Für die kupferfreie Variante der Sonogashira Kreuzkupplung werden zwei mögliche Katalysezyklen vorgeschlagen: ein Deprotonierungs- und eine Carbopalladierungsmechanismus (Schema 50). Beide beginnen mit der oxidativen Insertion des Aryljoids (**A**) gefolgt von der Koordination des Alkyns (**B**). Im Deprotonierungsmechanismus (links in Schema 50) wird das Alkin deprotoniert und der Palladium-Acetylid-Komplex **C** bildet sich. Durch reduktive Eliminierung werden das Alkin und die katalytisch aktive Palladium(0)-Spezies gebildet. Im Carbopalladierungsmechanismus (rechts in Schema 50) hingegen addiert sich das Palladium an die Dreifachbindung (**C'**). Das Alkin wird hier durch β -Hydrid Eliminierung aus **C'** gebildet.^[371]



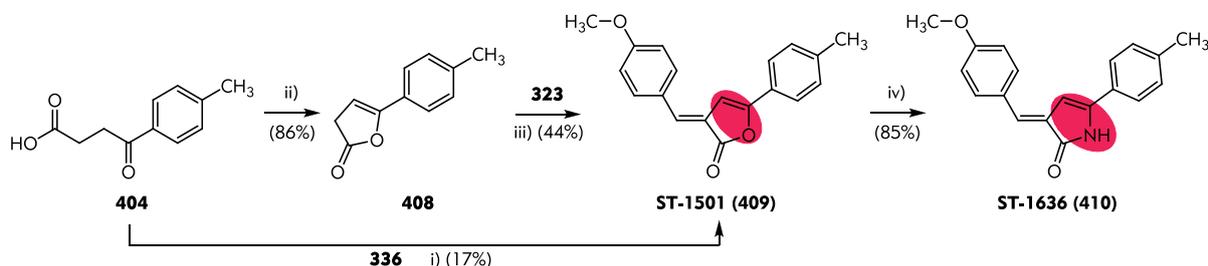
Schema 50: Zwei mögliche Mechanismen der kupferfreien Sonogashira Kreuzkupplung: links Deprotonierungsmechanismus, rechts Carbopalladierungsmechanismus; aus^[371]

4.2.2.7 C06-Kernvariationen

Da sowohl die polaren Aryliden-Aryl-Thiazolone als auch die Heteroaryl-derivate die flachen SAR bestätigten und sich gezeigt hat, dass eine bessere Wasserlöslichkeit mit verminderter Aktivität einhergeht, wurde der Fokus auf die Variierung des Thiazolonkerns gelegt.

4.2.2.7.1 Furan- und Pyrrol-C06-Analoga

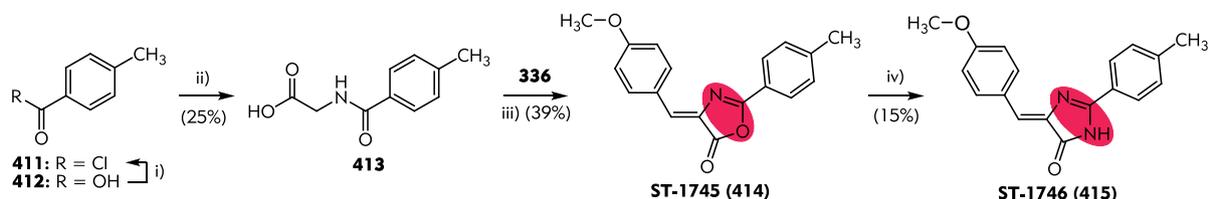
Das Furan-C06-Analogon **ST-1501 (409)** wurde ausgehend von γ -Ketosäure **407** hergestellt (Schema 51). Nach Sedavkina *et al.*^[372] wurde **407** mit 4-Methoxybenzaldehyd, **336**, frisch entwässertem Natriumacetat in Essigsäureanhydrid durch Erhitzen in **ST-1501 (409)** überführt. Diese Reaktion lieferte **409** in 17%iger Ausbeute. Um die Ausbeute an **ST-1501 (409)** zu erhöhen, wurde **396** mit Acetylchlorid aktiviert und zunächst zum (3*H*)-Furan **408** zyklisiert^[373], das in Lösung vollständig als Keton vorliegt. Verbindung **408** wurde dann analog zu der zweischrittigen Synthese der Aryliden-Aryl-Thiazolone in der Mikrowelle mit 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) in Methanol und katalytischen Mengen Piperidin umgesetzt (20 min, 100 °C). Aus diesem Ansatz konnte kein Produkt isoliert bzw. nachgewiesen werden. Das durch Zugabe der Base entstandene Produkt wurde durch das Erhitzen zersetzt. Folglich wurde die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt (30 min.) und lieferte **ST-1501 (409)** in 22% Ausbeute. Die Ausbeute der kinetisch kontrollierten Kondensation konnte durch Durchführung bei 0 °C auf 44% gesteigert werden. **ST-1501 (409)** wurde durch Behandlung mit Ammoniak in guten Ausbeuten in das Pyrrol-C06-Derivat **ST-1636 (410)** überführt. ^{nach [374]}



Schema 51: Synthese von (*E*)-3-(4-Methoxybenzyliden)-5-*p*-tolylfuran-2(3*H*)-on, **ST-1501 (409)** und (*E*)-3-(4-Methoxybenzyliden)-5-*p*-tolyl-1*H*-pyrrol-2(3*H*)-on, **ST-1636 (410)**: i) NaOAc, Ac₂O, 2 h, Reflux; ii) AcCl, 15 min, Reflux; iii) Piperidin, abs. MeOH, 15 min, 0 °C; iv) 4Å Molsieb, EtOH ges. NH₃, 36 h, RT, verschlossenes Vial.

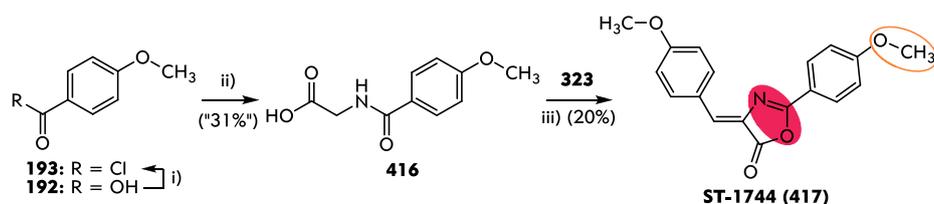
4.2.2.7.2 Oxazol-5(4H)-on- und Imidazol-C06-analogen

In ähnlicher Weise wurden die Oxazol-5(4H)-on- und das Imidazolanaloga **ST-1745 (414)** und **ST-1746 (415)** aufgebaut. 4-Methylbenzoesäure (**411**) wurde in das Säurechlorid **412** überführt und mit Glycin zum Amid **413** umgesetzt.^[375] **413** wurde dann in Essigsäureanhydrid mit 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) zum Oxazol-5(4H)-on **ST-1745 (414)** zyklisiert.^[376] Das Imidazol **ST-1746 (415)** wurde durch Erhitzen von **414** in Methanol mit Ammoniak und Natriumcarbonat erhalten.^[377]



Schema 52: Synthese von **ST-1745 (414)** und **ST-1746 (415)**: i) SOCl_2 , 1.5 h, Reflux; ii) Glycin, NaOH, H_2O , 30 min, 80 °C, dann konz. HCl; iii) Ac_2O , 50 min, 100 °C; iv) aq. NH_3 (25%), Na_2CO_3 , 15 h, Reflux.

Das Methoxyderivat **ST-1744 (417)** wurde auf demselben Weg wie **ST-1745 (414)** synthetisiert, wobei **193** ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.



Schema 53: Synthese von (Z)-4-(4-Methoxybenzyliden)-2-(4-methoxyphenyl)oxazol-5(4H)-on, **ST-1744 (417)**: i) SOCl_2 , 1.5 h, Reflux; ii) Glycin, NaOH, H_2O , 30 min, 80 °C, dann konz. HCl; iii) Ac_2O , 45 min, 100 °C.

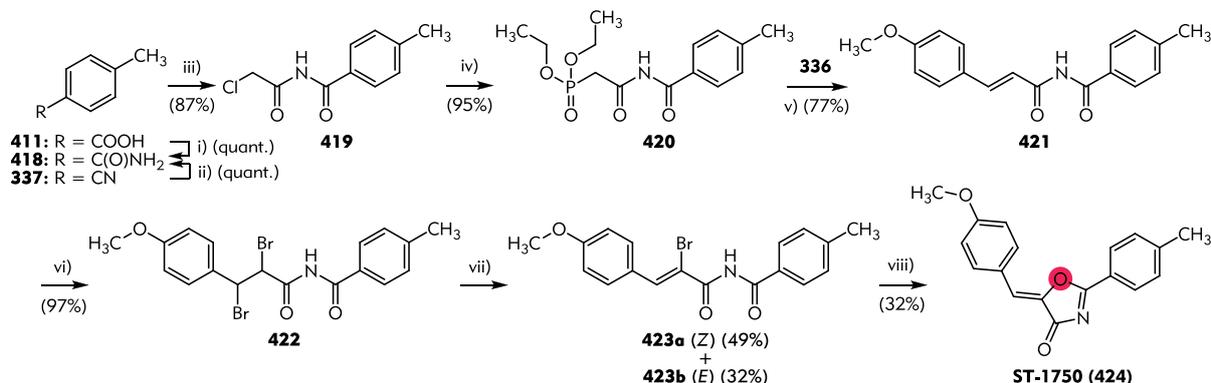
4.2.2.7.3 Oxi-C06-Analogen (Oxazol-5(4H)-on)

Die Synthese von 5-Aryliden-2-Aryl-oxazol-4(5H)-onen wird von Laxmi *et al.*^[378] durch Zyklisierung von (Z)-N-(2-Brom-3-Arylacryloyl)-4-benzamiden beschrieben. Dazu werden diese aus Benzamid mit Natriumhydrid und Zimtsäurechloriden in die N-Acryloylamide, wie **421**, überführt, bromiert und eliminiert.^[378]

Die von Laxmi *et al.*^[378] beschriebene Synthese von **421** aus 4-Methoxyzimtsäurechlorid und 4-Methylbenzamid (**418**) mit Natriumhydrid in THF führte nicht zur Bildung des Amids **421**, so dass ein anderer Syntheseweg gewählt wurde (Schema 54).

4-Methylbenzamid (**418**) wurde zum einen aus der Benzoesäure **411** durch Überführung in das Säurechlorid und anschließender Umsetzung mit Ammoniak gewonnen.^[379] Zum anderen wurde es durch oxidative Hydrolyse des Nitrils **337** erhalten.^[380] **418** wurde mit Chloracetylchlorid in **419** überführt.^[381] Der für die Wittig-Horner-Reaktion benötigte Phosphorsäureester **420** wurde durch Erhitzen des Chlorids **419** in Triethylphosphit^[381] in sehr guten Ausbeuten erhalten. Die Wittig-Horner-Reaktion mit 4-Methoxybenzaldehyd (**336**)^[381] liefert das N-Acryloylamid **421** in guten Ausbeuten. Untern den von Laxmi *et al.*^[378] angegebenen Bedingungen (Br_2 , HOAc, 4 h, RT) führt die Behandlung mit Brom neben der Bromierung der Doppelbindung auch zur Bromierung der Aromaten. Durch Bromierung bei 0 °C in Dichlormethan konnte eine Aromatenbromierung unterbunden werden und **422** wurde in sehr guten Ausbeuten isoliert. Die anschließende Eliminierung lieferte ausschließlich das N-2-Brom-Acryloylamid als (E) und (Z)-Isomerengemisch (**423a** (Z) und **423b** (E)). **423a** und **423b** konnten durch Kristallisation getrennt werden und die Identität wurde mittels NMR-Spektroskopie (^{13}C -, NOESY-, ^1H - ^{13}C -HSQC- und ^1H - ^{13}C -HMBC)

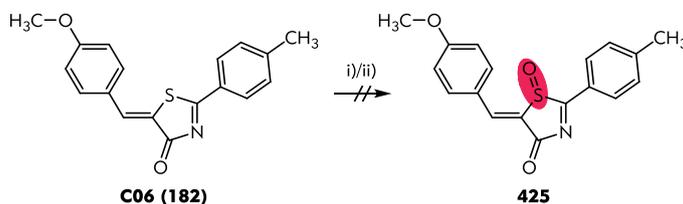
bestätigt. Die Zyklisierung zum Oxazol-4(5*H*)-on **ST-1750 (424)** durch Erhitzen in Dimethoxyethan mit Natriumhydrid^[378] erfolgte nur in Anwesenheit von Luftsauerstoff und nur im Falle des (*Z*)-Isomers **423a**.



Schema 54: Synthese von (*Z*)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-*p*-tolylloxazol-4(5*H*)-on, **ST-1750 (424)**: i) a) SOCl₂, 1.5 h, Reflux, b) aq. NH₃ (25%), 10 min, 0 °C; ii) 25% NaOH, 30% H₂O₂, abs. EtOH, 2.5 h, RT; iii) Chloroacetylchlorid, Ar, 45 min, 110 °C; iv) P(OEt)₃, 1 h, 150 °C; v) DBU, THF, 72 h, RT; vi) Br₂, DCM, 20 min, RT; vii) NEt₃, DCM, 5 h, RT; viii) NaH, DME, 17 h, 0 °C → Reflux.

4.2.2.7.4 Sulfoxid-C06-Analogon

Während der Variationen des Thiazolonkerns von **C06** wurden auch Versuche unternommen, das am Schwefel oxidierte **C06**-Derivat **425** zu synthetisieren (Schema 55). Die Umsetzung von **C06 (182)** mit Wasserstoffperoxid führte zu teilweisen Zersetzung.^[382] Auch die Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) bei verschiedenen Temperaturen^[383-385] führte nicht zur Bildung **425**. Bei Raumtemperatur war keinerlei Reaktion zu beobachten und bei höheren Temperaturen kam es zur Zersetzung von **C06**.

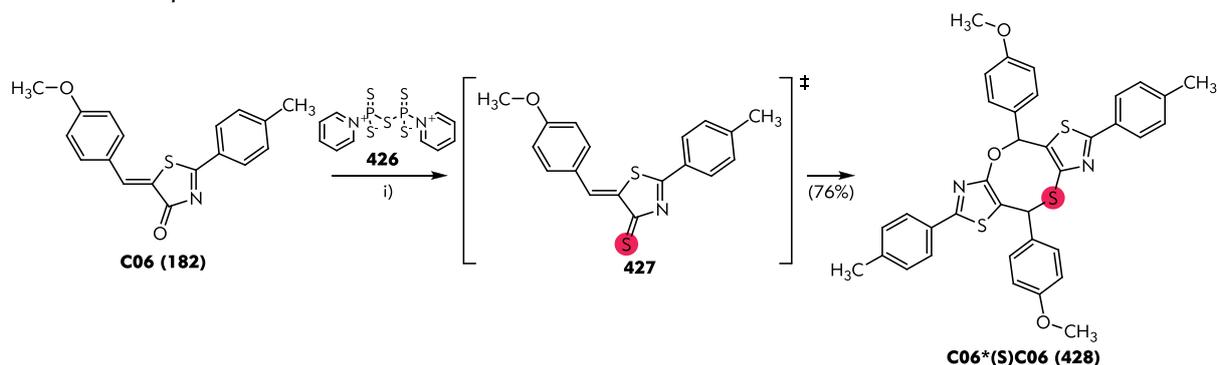


Schema 55: Oxidation des Thiazolon-Schwefels zu **425**: i) 30% H₂O₂, MeOH, 1.5 h, Reflux; ii) mCPBA, abs. DCM, 24 h / 5 h, 0 °C → RT / Reflux.

4.2.2.7.5 Thion-C06-Analogon

Um die Bedeutung der einzelnen Strukturelemente der Aryliden-Aryl-Thiazolone evaluieren zu können wurde auch die Synthese des Thion-**C06**-Analogons **427** forciert. Die Umsetzung von **C06 (182)** mit Lawessons Reagenz in Toluol (2.5 h, 85 °C)^[386] lieferte neben einem nicht identifizierten Produkt, das kein Proton an der Doppelbindung aufwies, hauptsächlich nicht umgesetztes **C06**. Durch lösemittelfreie Thionierung mit Lawessons Reagenz in der Mikrowelle (300 W, 15 min, 200 °C)^[387] konnte ebenfalls nur Edukt und geringe Mengen Zersetzungsprodukt erhalten werden. Die Reaktion von **C06** mit Phosphorpentasulfid und Natriumhydrogencarbonat in THF (4 h, RT)^[388] zeigte keinerlei Umsetzung. Durch Verwendung von Phosphorpentasulfid-Pyridin-Komplex (**426**) als Thionierungsmittel in Sulfolan (30 min, 170 °C)^[389] konnte nur Edukt und geringe Mengen Zersetzungsprodukt erhalten werden. Bei der Umsetzung von **C06** mit **426** in Acetonitril^[389] konnte das Dimer **C06*(S)C06 (428)** in 76% Ausbeute isoliert werden (Schema 56). Die Anwesenheit des Schwefels in **428** zeigt, dass sich das gewünschte Thion-**C06**-Analogon **427** gebildet hat. Die Bildung des Dimers **428** lässt auch eine hohe Reaktivität des

Thia-C06 (**427**) schließen, dass mit C06 zu **428** in einer Michael-artigen Reaktion reagiert. Die Identität von **428** wurde durch NMR-Spektroskopie (^1H -, ^{13}C -, ^1H - ^{13}C -HSQC- und ^1H - ^{13}C -HMBC) und Massenspektrometrie bewiesen.

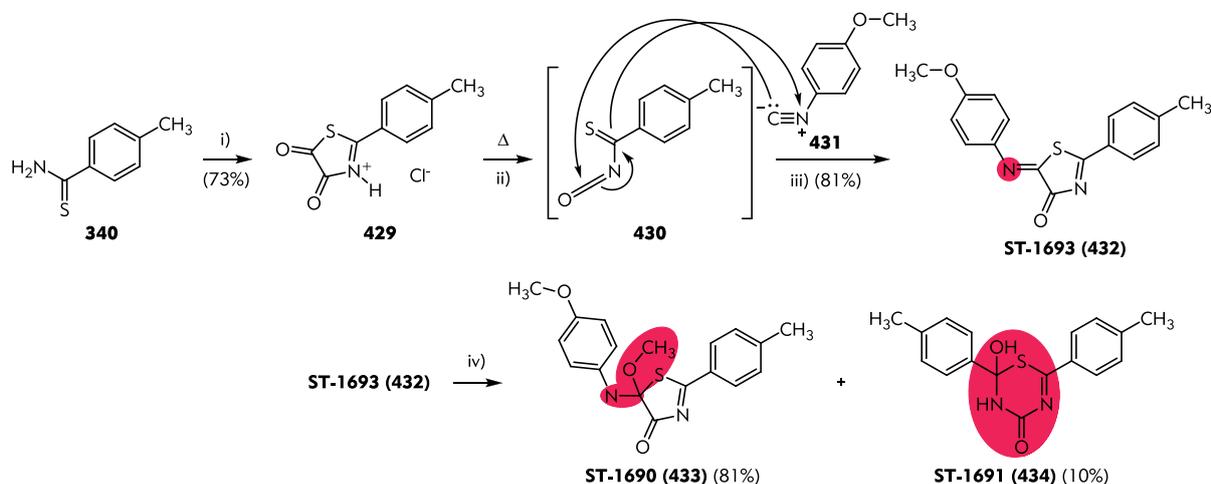


Schema 56: Synthese von C06*(S)C06 (**428**) über (Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolylthiazole-4(5H)-thion, **427**:
i) abs. MeCN, 30 min, Reflux.

4.2.2.7.6 Imino-C06-Analogon

Zur Synthese Imino-C06-Analogons, in dem das Kohlenstoffatom in der Yliden-Einheit gegen ein Stickstoffatom ausgetauscht ist, wurde zunächst das Thioamid **340** mit Oxalylchlorid zum Diketon **429** umgesetzt. Diese spaltet bei Erhitzen in Xylol Kohlenmonoxid ab und bildet das Thio-acyl-isocyanat **430**, das ohne weitere Aufreinigung mit Isocyan-4-methoxybenzol (**431**) zu ST-1693 (**432**) umgesetzt wurde.^[390,391]

Durch Erhitzen von ST-1693 (**432**) in Methanol konnten ST-1690 (**433**) und ST-1691 (**434**) durch Addition bzw. Addition und Umlagerung erhalten werden.

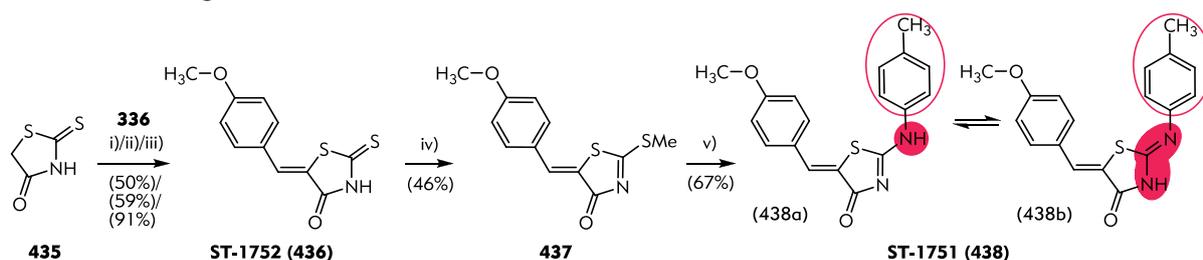


Schema 57: Synthese von ST-1693 (**432**), ST-1690 (**433**) und ST-1691 (**434**): i) $(\text{CO})_2\text{Cl}_2$, abs. Aceton, 10 min, 0 °C (73%), ii) abs. Xylol, 5 min, 155 °C; iii) 0 °C, **431**, → RT, 5 min; iv) MeOH, 30 min, Reflux.

4.2.2.7.7 Amino-/Imino-Thiazolon-C06-Analogon

Das Amino- bzw. Iminothiazolon sind C06-Analoga in denen der 2-Arylrest durch das zusätzliche Stickstoffatom eine hohe konformationelle Flexibilität aufweist. Rhodanin (**435**) wurde unter verschiedenen Bedingungen^[392,393] mit 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) zu (Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on, ST-1752 (**436**), kondensiert (Schema 58). Die Kondensation analog zu der zweischrittigen, mikrowellenassistenten Aryliden-Aryl-Thiazolon-Synthese lieferte die höchste Ausbeute von 91%^[394]. Die Behandlung von **436** mit Methyljodid in Ethanol lieferte

den Thiomethylether **437**, der mit Tolyamin in einer Additions-Eliminierungsreaktion zu **ST-1751 (438)** umgesetzt wurde.^[395]



Schema 58: Synthese von **ST-1752 (436)**: i) NaOAc, HOAc, 60 min, 100 °C; ii) TBAB, H₂O, 16 min, 100 °C, μ w; iii) Piperidin, abs. EtOH, 10 min, 100 °C, μ w; iv) MeI, DIPEA, abs. EtOH, 3 h, Reflux; v) *p*-H₂N-tolyl, DIPEA, abs. Dioxan, 20 min, 150 °C, μ w.

ST-1751 (438) liegt in Lösung als Tautomerengleichgewicht zwischen dem Amin **438a** und dem Imin **438b** vor, wobei der Aminanteil leicht überwiegt (siehe Abbildung 52).

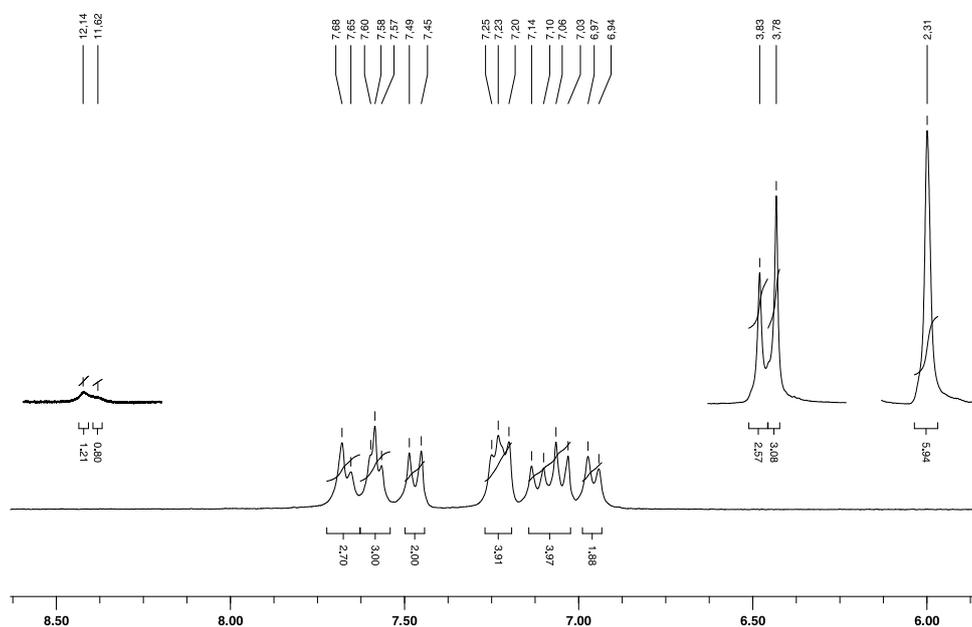
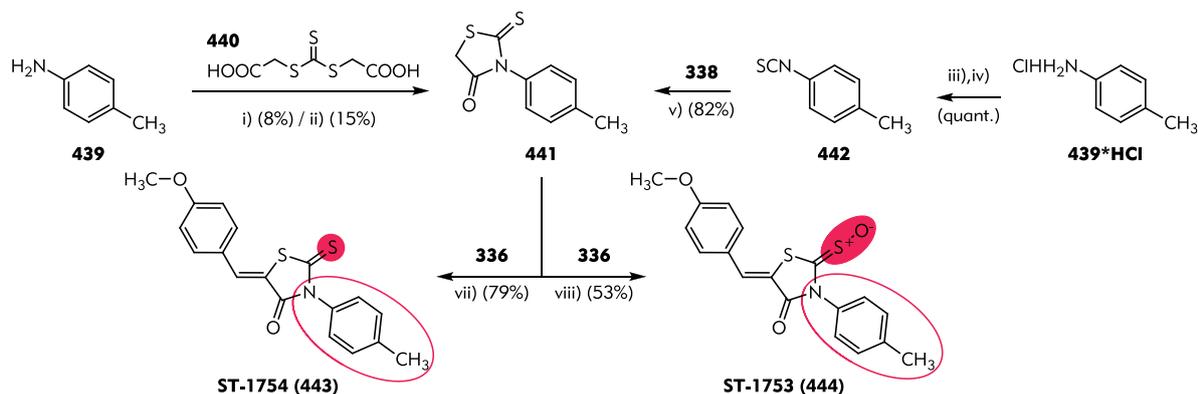


Abbildung 52: ¹H-NMR Spektrum von **ST-1751 (438)** in *d*₆-DMSO

4.2.2.7.8 Thioxathiazolidinon-C06-Analogen

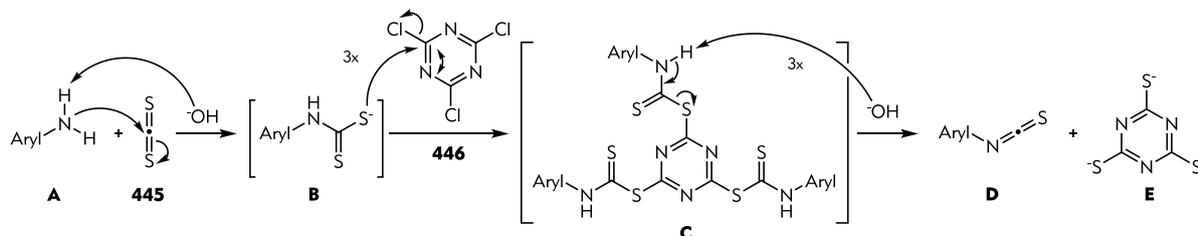
(*E*)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-thio-3-*p*-tolylthiazolidin-4-on, **ST-1754 (443)**, weist, verglichen mit **C06**, eine andere Anordnung der beiden Arylrest zueinander auf. Es wurde ausgehend von 4-Aminotoluol (**439**) synthetisiert (Schema 59). Der Ringschluss zum Thioxothiazolidinon **441** erfolgte in einer mikrowellenassistenten Reaktion zwischen **439** und 2,2'-Thiocarbonylbis(sulfandiyl)diessigsäure (**440**)^[396] wobei **441** in nur 8% Ausbeute erhalten werden konnte. Unter konventioneller Erhitzung^[397] wurde **441** in 15% Ausbeute isoliert. Ein anderer Syntheseweg zu **441** führt über das Isothiocyanat **442**. Dazu wurde das Anilin **439**·HCl in quantitativen Ausbeuten in **442** überführt^[398], das dann mit Thioglykolsäuremethylester (**338**) bei 0 °C, in **441** überführt wurde^[399]. Das CH-azide Thioxothiazolidinon **441** wurde anschließend unter Ammoniumacetat/Essigsäurekatalyse mit 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) in der Mikrowelle zu **ST-1754 (443)** kondensiert.^[399] Bei der mikrowellenassistenten Kondensation von **441** und **336** in Ethanol mit katalytischen Mengen Piperidin wurde das entsprechende S-Oxid Derivat von **443** **ST-1753 (444)** isoliert.

4.2.2.7 C06-Kernvariationen



Schema 59: Synthese von **ST-1754 (443)** und **ST-1753 (444)**: i) H₂O, 15 min, 160 °C, $\mu\omega$; ii) H₂O, 2 h, Reflux; iii) K₂CO₃, CS₂, H₂O, 3 h, RT; iv) Cyanurchlorid, abs. DCM, 3 h, 0 °C; v) NEt₃, DCM, 2 h, 0 °C → RT; vi) NH₄OAc, HOAc, 15 min, 130 °C, $\mu\omega$; vii) Piperidin, abs. EtOH, 15 min, 100 °C, $\mu\omega$.

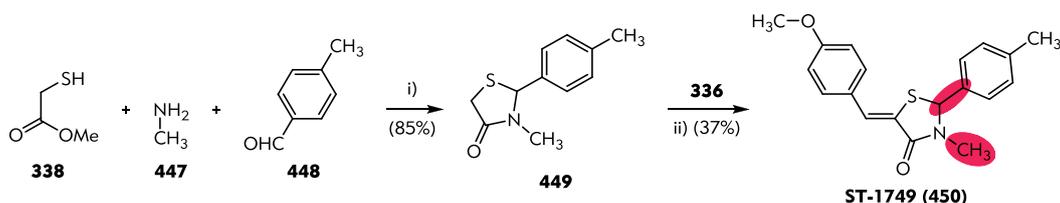
Der Mechanismus der Synthese von Isothiocyanaten aus Arylaminen ist in Schema 60 gezeigt.^[398] Das Arylamin **A** reagiert mit Kohlenstoffdisulfid (**445**) zum Carbamodithionat **B**, welches in einer Additions-Eliminierungsreaktion an Cyanurchlorid (**446**) addiert wird. Durch Eliminierung entstehen aus **C** drei Moleküle Arylisothiocyanat (**D**) und **E**.



Schema 60: Mechanismus der Isocyanatbildung mit Cyanurchlorid (**446**) aus Arylaminen und Kohlenstoffdisulfid (**445**) im Basischen.^[398]

4.2.2.7.9 N-Methyl-C06-Analogon

Die direkte Synthese des *N*-methylierten **C06**-Derivats durch reduktive Aminierung von **C06** mit Formaldehyd und Natriumtriacetoxyborhydrid lieferte keinerlei Umsetzung, weshalb zunächst der *N*-Methylthiazolidinonring **449** aufgebaut wurde. Tolylaldehyd (**448**) wurde mit wässriger Methylamin-Lösung (**447**, 40% in Wasser) in Tetrahydrofuran versetzt und dann wurde Thioglykolsäure (**335**) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) hinzugegeben.^[400] Neben dem Aldehyd **448** wurde geringe Mengen des Lactons aus **335** und **448** isoliert. Die Reaktion zwischen **448**, wässriger Methylamin-Lösung und Thioglykolsäure (**335**) in Toluol am Wasserabscheider^[401,402] lieferte ebenfalls kein *N*-Methylthiazolidinon **449**. Durch Verwendung des Methylesters **338** konnte **449** in guten Ausbeuten erhalten werden (Schema 61). Die Kondensation mit 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) in Ethanol und katalytischen Mengen Piperidin oder Natriummethanolat (Mikrowellenreaktion) lieferte keine Umsetzung. Auch durch die Verwendung von Lithiumdiisopropylamin in THF konnte **ST-1749 (450)** nicht erhalten werden. In einer mikrowellenassistierten Reaktion mit Natriumhydroxid als Base konnte **450** synthetisiert werden.



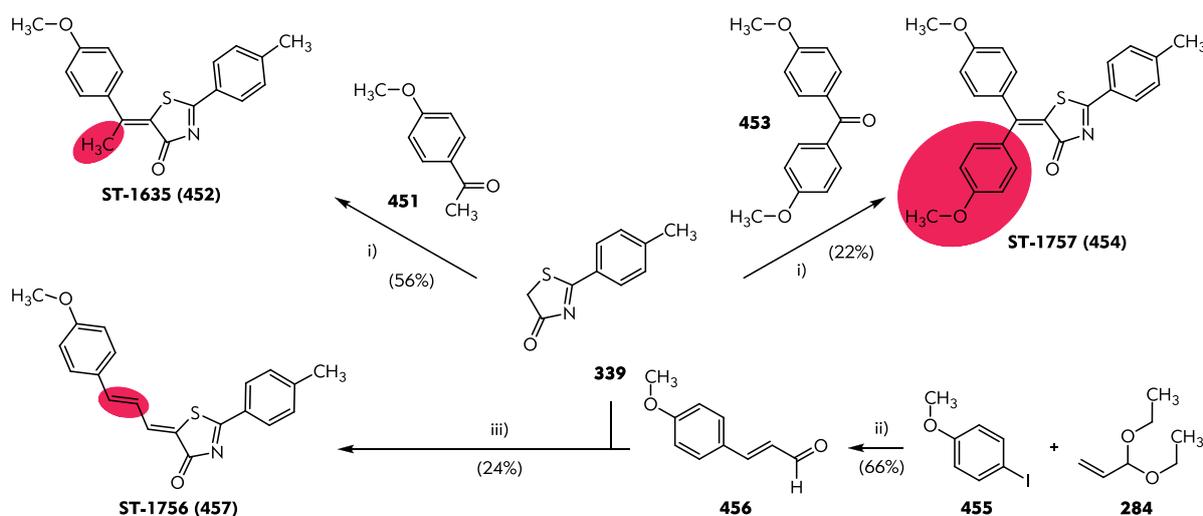
Schema 61: Synthese von (*Z*)-5-(4-Methoxybenzyliden)-3-methyl-2-*p*-tolylthiazolidin-4-on, **ST-1749 (450)**: i) THF, 22 h, RT → 50 °C; ii) NaOH, abs. EtOH, 20 min, 100 °C, $\mu\omega$.

4.2.2.8 Arylidenvariationen

Die Variationen am Thiazolonkern zeigten, dass die 2-Arylthiazolstruktur, ebenso wie der 2-Arylrest^[225], wichtig für die 5-LO-Aktivität sind. Daher wurden Veränderungen an der Arylideinheit vorgenommen.

4.2.2.8.1 Substituierte und verlängerte Ylideneinheit

Die an der Ylideneinheit substituierten C06-Derivate wurden auf dem zweischrittigen Syntheseweg aufgebaut (Schema 62). 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) wurde jeweils mit 4-Methoxyacetophenon (**451**) und bis(4-Methoxyphenyl)methanon (**453**) in der Mikrowelle zu **ST-1635** (**452**) und **ST-1757** (**454**) kondensiert. Die Aldolreaktion mit den unreaktiveren Ketonen wurde bei 130 °C in Toluol und mit Ammoniumacetat als Base durchgeführt.^{nach[403]}

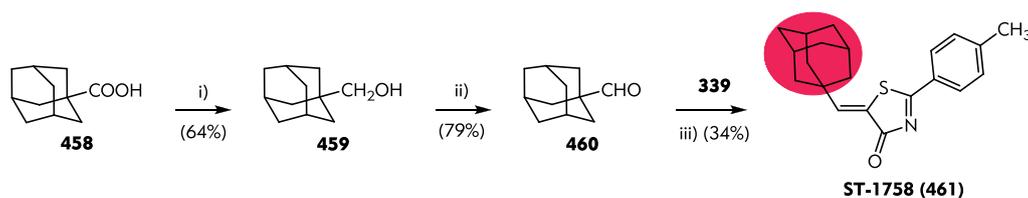


Schema 62: Synthese von **ST-1635** (**452**), **ST-1757** (**454**) und **ST-1756** (**457**): i) NH_4OAc , Toluol, 45 min, 130 °C, μw ; ii) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, K_2CO_3 , abs. DMF, 2 x 10 min, 90 °C, μw ; iii) Piperidin, abs. MeOH, 10 min, 100 °C, μw .

Für die Synthese des um eine Doppelbindung verlängerten C06-Derivats **ST-1756** (**457**) wurde zunächst (*E*)-3-(4-Methoxyphenyl)acrylaldehyd (**456**) durch Heck-Reaktion von 4-Iodoanisol (**455**) und Acroleindiethylacetal (**284**) synthetisiert (Mechanismus vgl. Schema 27).^[404] Die Kondensation mit **339** erfolgte mit Piperidin in Methanol in der Mikrowelle.

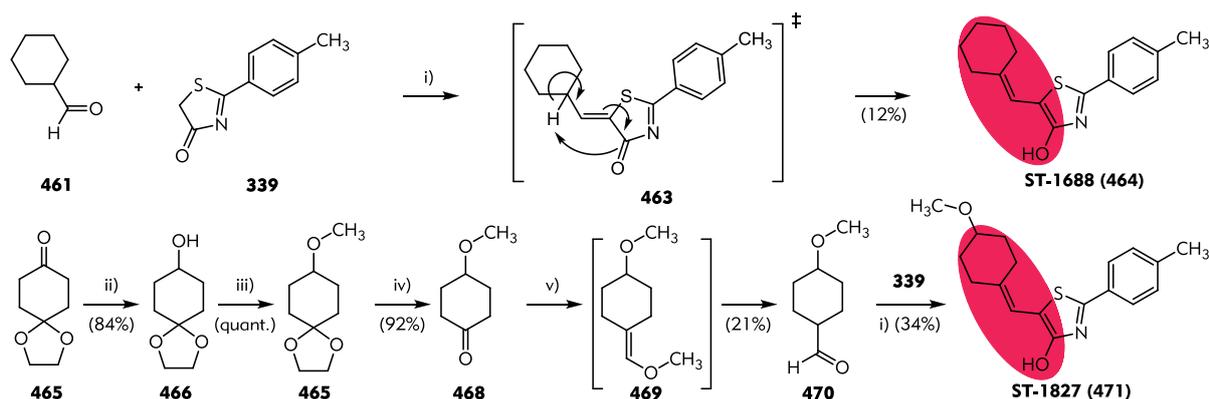
4.2.2.8.2 Nicht-aromatische Yliden-Substituenten

Um die Notwendigkeit eines aromatischen 5-Arylidensrestes bewerten zu können wurde ein 5-Adamantylidenderivat, **ST-1758** (**461**), synthetisiert (Schema 63). Adamantylcarbonsäure (**458**) wurde mit Lithiumaluminiumhydrid zum Alkohol **459** reduziert^[405] und anschließend mittels Swern-Oxidation in den Aldehyd **460** überführt^[406]. Die Kondensation mit 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) erfolgte in Methanol mit Piperidin in der Mikrowelle.



Schema 63: Synthese von (*Z*)-5-(Adamantylmethyl)-2-*p*-tolylthiazol-4(5*H*)-on, **ST-1758** (**461**): i) LiAlH_4 , THF, 2 h, RT; ii) $(\text{COCl})_2$, abs. DMSO, abs. DCM, 1 h, -60 °C, NEt_3 , 15 min, RT; iii) Piperidin, abs. MeOH, 10 min, 100 °C, μw .

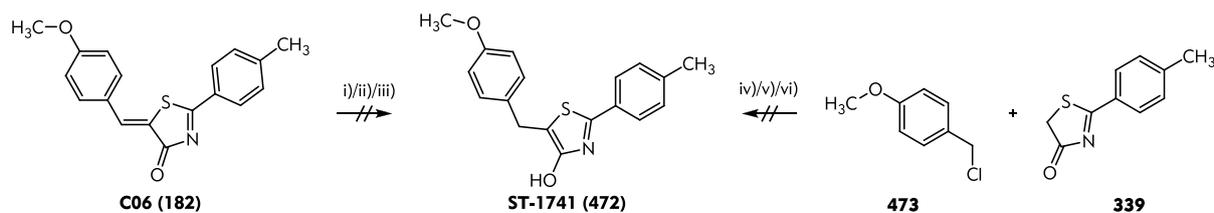
Neben einem raumfüllenden Adamantylrest wurden auch Derivate mit Cyclohexylsubstituenten synthetisiert. Dazu wurde Cyclohexylcarbaldehyd, **462**, mit **339** in der Mikrowelle mit katalytischen Mengen Piperidine umgesetzt (Schema 64). Das Kondensationsprodukt **463** tautomerisiert in vinyloger Weise zum Hydroxythiazol **ST-1688** (**464**). Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde zudem das entsprechende Methoxyderivat **ST-1827** (**470**) synthetisiert. Das 1,4-Cyclohexyldionacetal **465** wurde mit Natriumborhydrid zum Alkohol **466** reduziert,^[407] zu **467** methyliert und das Acetal gespalten (**468**)^[407,408]. Verbindung **468** wurde dann in einer Wittigreaktion mit (Methoxymethyl)triphenylphosphoniumchlorid zum Acetal **469** umgesetzt, dass *in situ* zum Aldehyd **470** hydrolisiert wird.^[409]



Schema 64: Synthese von 5-(Cyclohexyldenemethyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol, **ST-1688** (**464**), und 5-((4-Methoxycyclohexyldenemethyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol, **ST-1827** (**470**): i) Piperidin, abs. MeOH, 10 min, 100 °C, $\mu\omega$; ii) NaBH_4 , abs. MeOH, 3 h, 0 °C \rightarrow RT; iii) NaH, MeI, abs. THF, 17 h, 0 °C \rightarrow RT; iv) 1M HCl, 30 min, Reflux; v) $\text{MeOCH}_2\text{PPh}_3\text{Cl}$, LDA, abs. THF, 30 min, 0 °C, dann **465**, THF, 1 h, -78 °C, 18 h, RT, dann 2M HCl, 3 h, RT.

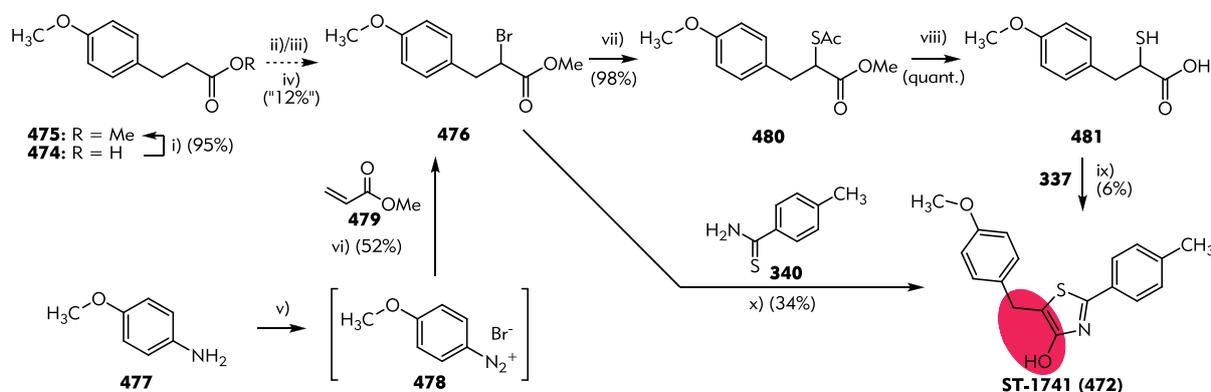
4.2.2.8.3 C06 mit „hydrierter Doppelbindung“

Zur weiteren Erforschung der Struktur-Affinitätsbeziehung der Aryliden-Aryl-Thiazole wurden verschiedene Synthesen zur Herstellung des hydrierten Yliden-C06-Derivats bzw. zu dessen Enoltautomer - dem Benzylhydroxythiazol **ST-1741** (**472**) - durchgeführt (Schema 65). Die direkte Reduktion der Doppelbindung in **C06** (**182**) mit Natriumborhydrid oder Natriumcyanoborhydrid^[410] zeigte keinerlei Umsetzung. Auch durch Zusatz von Dimethylglyoxim und Cobalt(II)chlorid – wie es in der Literatur^[411] zur Reduktion von Ylidenethiazol-4(5*H*)-onen beschrieben wird – konnte **C06** (**182**) nicht reduziert werden. In beiden Fällen wurde **C06** unverändert isoliert. Die Hydrierung mit Übergangsmetallen (Palladium oder Platin) unter verschiedensten Bedingungen (s. iii) in Schema 65) führte nicht zur Reduktion. Auch durch eine analog zur zweischrittigen Aryliden-Aryl-Thiazolonsynthese durchgeführte Kondensation zwischen 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**326**) und 4-Methoxybenzylchlorid (**473**) unter verschiedenen Bedingung (s. iv)-vi) in Schema 65) konnte **ST-1741** (**472**) nicht erhalten werden.



Schema 65: Synthesewege zu 5-(4-Methoxybenzyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol, **ST-1741** (**472**): i) NaBH_4 / NaCNBH_3 , MeOH/THF, 8 h, 0 °C \rightarrow Reflux/40 °C; ii) Dimethylglyoxim, $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , MeOH:THF:H₂O (4:1:1), 2 h, 0 °C \rightarrow RT; iii) Pd/C / Pt/C, 1-5 bar H₂, abs. EE/CHCl₃/MeOH/EtOH/HOAc, 6-24 h, RT \rightarrow 70 °C; iv) abs. EtOH, 8 h, RT \rightarrow 50 °C; v) NEt_3 , abs. MeOH, 3 x 15 min, 70 °C, $\mu\omega$; vii) NaH, abs. DMF, dann **473**, 5 h, RT \rightarrow 80 °C.

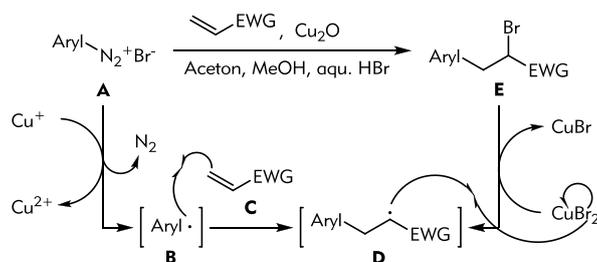
Da die Versuche **C06 (182)** zu **ST-1741 (472)** reduzieren oder **ST-1741 (472)** durch Kondensation zu synthetisieren misslangen, wurde eine Syntheseroute zum Aufbau des Thiazolonerüst durch Ringschluss zwischen einer substituierten Thioglykolsäure und einem aromatischen Nitril,^[412] analog der Synthese von 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) entwickelt (Schema 66). Zur Synthese der substituierten Thioglykolsäure **481** wurde zunächst 3-(4-Methoxyphenyl)propansäure (**474**) durch eine mikrowellenassistierte Veresterung^[413] in den Ester **475** überführt. Verbindung **475** konnte durch Bromierung unter verschiedenen Bedingungen nur teilweise in das Bromid **476** überführt werden. Die direkte Umsetzung des bei tiefen Temperaturen, mit unterschiedlichen Basen, gebildeten Enolats von **475** mit Brom oder *N*-Bromsuccinimid (NBS) führt nur zu Bildung nicht identifizierter Produkt neben großen Mengen an unreaktiertem Ester **475**. Durch Zutropfen einer Bromlösung konnte eine nichttrennbare Mischung aus **475** und **476** (ca. 1:0.13) erhalten werden, deren Anteil an dem Bromid **476** durch Variation der Reaktionsparameter nicht gesteigert werden konnte. Da die α -Bromierung des Esters **475** nicht optimiert werden konnte, wurde **476** ausgehend von 4-Methoxyanilin (**477**) durch Meerweinylierung^[414] des Diazoniumbromids **478** mit Methylacrylat (**479**) synthetisiert^[415] (Mechanismus s. Schema 67). Verbindung **476** konnte durch Destillation im Vakuum aufgereinigt werden. Zur Einführung des Schwefels wurde das Bromid **476** mit dem Natriumsalz der Thioessigsäure^[416,417] umgesetzt (**480**). Die Abspaltung der Acetylgruppe und die Esterspaltung zur substituierten Thioglykolsäure **481** erfolgten in einem Schritt durch Erhitzen mit Kaliumhydroxyd.^[416,417] **ST-1741 (472)** konnte durch Umsetzung von **481** mit Tolunitril (**337**)^[412] in der Mikrowelle in 6%iger Ausbeute erhalten werden. Die direkte Synthese aus dem Bromid **476** durch Ringschluss mit 4-Methylbenzothioamid (**340**) im Pyridin lieferte **ST-1741 (472)** in 34%iger Ausbeute.^{nach[412,418]}



Schema 66: Synthese von 5-(4-Methoxybenzyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol, **ST-1741 (472)**: i) konz. H_2SO_4 , MeOH, 15 min, 100 °C, μw ; ii) LDA, abs. THF, 15 min, -78 °C, Br_2/NBS , 4 h, $\rightarrow\text{RT}$; iii) NaH, abs. THF, 1.5 h, 0 °C, Br_2 , 3 h, RT \rightarrow 40 °C; iv) LDA, abs. THF, 15 min, -78 °C, tropfenweise Br_2 , THF, 14 h, $\rightarrow\text{RT}$; v) NaNO_3 , aq. HBr, Aceton:MeOH (2.6:1), 30 min, 0 °C; vi) Cu_2O , 1.5 h, RT; vii) HSAc, NaH, abs. DMF, 20 min, 0 °C, dann **476**, abs. DMF, 1 h, 0 °C; viii) KOH, MeOH, 10 h, 80 °C; xi) NEt_3 , MeOH, 30 min, 100 °C, μw ; x) Pyridin, 19 h, Reflux.

Das Kupfer(I) wirkt in der Meerwein-Arylierung als Reduktionsmittel und setzt unter Ausbildung eines Arylradikals **B** aus dem Diazoniumsalz **A** Stickstoff frei (Schema 67). Das Michael-System **C** addiert sich an das Arylradikal **B**, und Kupfer(II)bromid überträgt unter Reduktion zu Kupfer(I) ein Bromatom auf das entstandene Allylradikal **D** zu **E**.^[419]

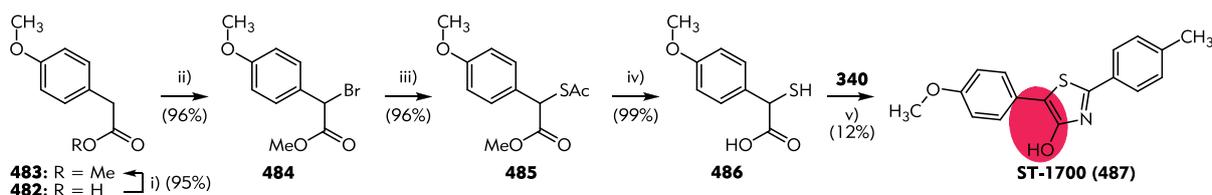
4.2.2.8 Arylidenvariationen



Schema 67: Allgemeiner Mechanismus der Meerwein-Arylierung nach ^[419] (EWG = *electron-withdrawing group*).

4.2.2.8.4 Aryl-Aryl-Hydroxythiazole

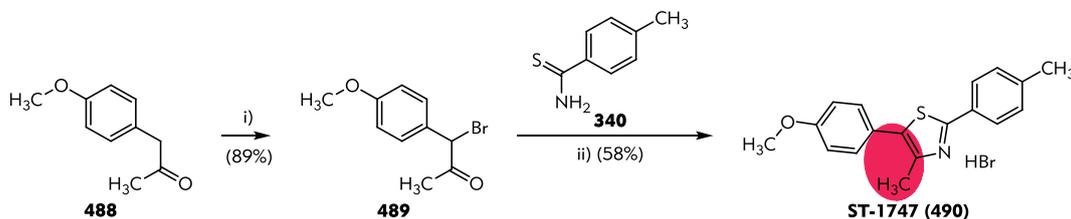
Mit **ST-1741 (472)** konnte gezeigt werden, dass die Ylideneinheit nicht essentiell für die 5-LO-Aktivität ist. Daher wurde als weitere Arylidenvariation das **C06**-Derivat ohne Methyleneinheit zwischen Thiazol und dem 5'-Arylrest synthetisiert. Dazu wurde analog zur Synthese von **ST-1741 (473)** zunächst 4-Methoxyessigsäuremethylester (**483**) in einer mikrowellenassistenten Veresterung^[413] aus **482** hergestellt (Schema 68). Verbindung **483** wurde radikalisch mit NBS bromiert^[420] (**484**), mit Thioessigsäure in das Acetylthiol **485** überführt^[416,417] und die Thioglykolsäure **486** durch Behandlung mit Kaliumhydroxid freigesetzt^[416,417]. Durch mikrowellenassistierte Zyklisierung der substituierten Arylthioglykolsäure **486** mit Tolunitril (**337**) wurde 5-(4-Methoxyphenyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol, **ST-1700 (487)** erhalten.



Schema 68: Synthese von 5-(4-Methoxyphenyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol, **ST-1700 (487)**: i) konz. H₂SO₄, MeOH, 15 min, 100 °C, μ w; ii) NBS, AIBN, CCl₄, 5 h, Reflux; iii) NaH, HSAc, abs. DMF, 1 h, 0 °C; iv) KOH, MeOH, 5.5 h, 80 °C; v) NEt₃, 25 min, 100 °C, μ W.

4.2.2.8.5 Aryl-Aryl-Methylthiazol

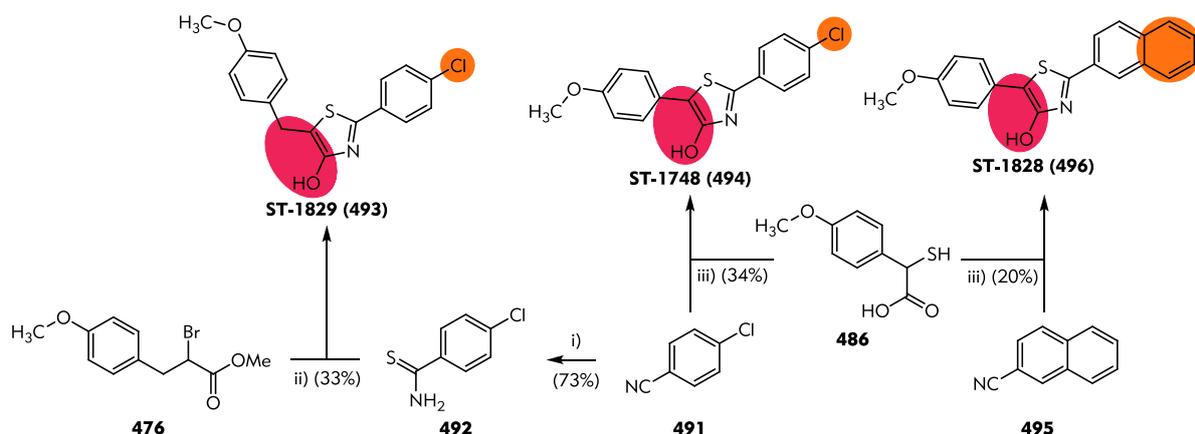
Zur Evaluierung der Hydroxythiazolstruktur wurde das entsprechende Methylthiazol synthetisiert. Bromierung von 1-(4-Methoxyphenyl)propan-2-on (**488**) lieferte das Bromid **489**,^[421] dass in einer mikrowellenassistenten Hantzsch-Thiazolsynthese mit dem Thioamid **340** in das Diarylmethylthiazol **ST-1747 (490)** überführt wurde.



Schema 69: Synthese von 5-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-2-*p*-tolylthiazolium Hydrobromid, **ST-1747 (490)**: i) Br₂, Et₂O, 20 min, 0 °C → RT; ii) EtOH, 10 min, 100 °C, μ w.

4.2.2.9 Optimierte Aryl-(Methylen)-Aryl-Hydroxythiazole

Entsprechend der SAR der Substituenten am 2-Arylrest von Hofmann *et al.*^[225] und Barzen und Rödl *et al.*^[249], in der durch den Austausch von Methyl gegen Chlor eine erhebliche Affinitätssteigerung erzielt werden konnte, wurden das Chlorderivat von **ST-1747 (472)** und das Chlor- und Naphtylderivat von **ST-1700 (487)** in analoger Weise synthetisiert (Schema 70). Zur Synthese von **ST-1829 (493)** wurde zunächst 4-Chlorbenzothioamid (**492**) in einer mikrowellenassistenten Reaktion aus 4-Chlorbenzonitril (**491**) und Ammoniumsulfid synthetisiert^[343]. Verbindung **492** wurde mit dem α -Bromester **476** durch Erhitzen in Pyridin zu 5-(4-Chlorbenzyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol, **ST-1829 (493)**, zyklisiert. **ST-1748 (494)** und **ST-1828 (496)** wurden jeweils durch Mikrowellenzyklisierung zwischen 2-Mercapto-2-(4-methoxyphenyl)essigsäure (**486**) und dem entsprechenden Nitril **491** bzw. **495** erhalten.^{nach[412,418]}



Schema 70: Synthese von **ST-1827 (493)**, **ST-1748 (494)** und **ST-1828 (496)**: i) aq. 40% $S(NH_4)_2$, abs. MeOH, 25 min, 80 °C, μW ; ii) Pyridin, 19 h, Reflux; iii) NEt_3 , 25 min, 100 °C, μW .

5. Diskussion und Ergebnisse / Pharmakologische Testung

5.1 SIP_1 -Liganden

5.1.1 Dynamische Massen-Umverteilung (DMR) zur Messung der Bindungsaffinität

Die Bindung eines Moleküls an einen G Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) führt zur Aktivierung einer spezifischen Signalkaskade bzw. zum Freiwerden von spezifischen sekundären Messengern, die als Read-Out für klassische Assaysysteme benutzt werden können. Neben dieser Modulation der Zellfunktion kommt es auch immer zu einer Umverteilung bzw. Relokation von Zellbestandteilen.^[422] Diese Relokation wird als dynamische Massen-Umverteilung (dynamic mass redistribution = DMR) bezeichnet und kann durch die gleichzeitige Änderung der optischen Dichte detektiert werden (Abbildung 53).^[423] Diese Art der Messung der Aktivierungen einer GPCRs wird als „label-free“-Messung bezeichnet.^[422,424,425]

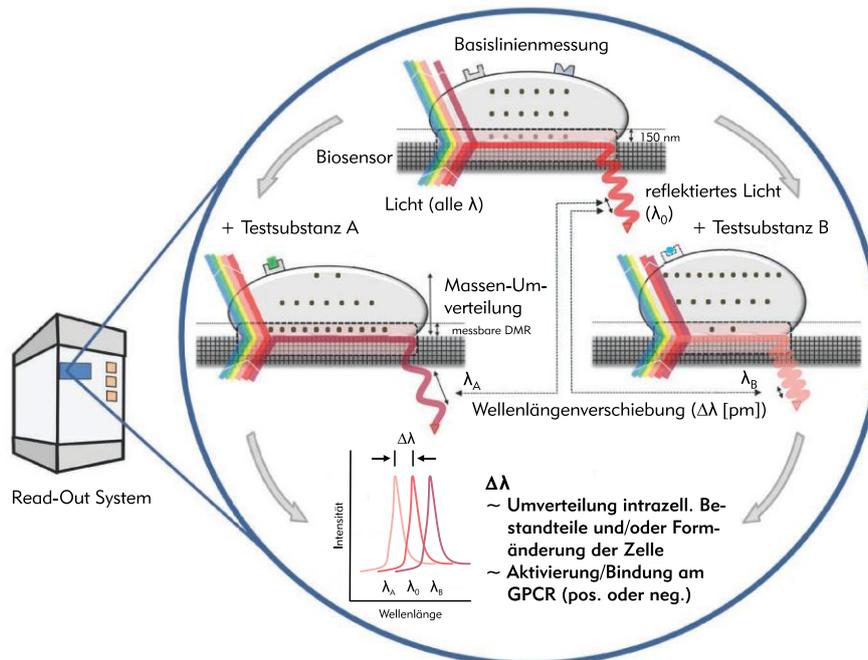


Abbildung 53: Prinzip der Messung der Bindungsaffinität einer Substanz an einen GPCR durch Veränderung der dynamischen Massen-Umverteilung DMR und Messung der optischen Dichte.^{nach[314,425]}

In einer Mikroplatte werden Zellen von unten mit polarisiertem Licht aller Wellenlängen bestrahlt. Durch einen optischen Biosensor (beinhaltet ein Schmalband-Resonanz-Reflexionsgitter) wird nur Licht einer spezifischen Wellenlänge, in Abhängigkeit der optischen Dichte, reflektiert. Die dynamische Massen-Umverteilung und/oder eine Veränderung der Zellform, welche durch die Bindung am GPCR hervorgerufen wird, verschiebt die Wellenlängen des reflektierten Lichts ($\Delta\lambda$) im pm-Bereich. Durch Vergleich mit einer Basislinienmessung (λ_0) bzw. der Messung einer Referenzsubstanz kann somit die Bindung eines Moleküls an dem GPCR qualifiziert und quantifiziert werden. Dabei sind sowohl positive (λ_B) als auch negative (λ_A) Verschiebungen der Wellenlängen (agonistisches und antagonistisches Verhalten) messbar.^[314,424,425]

5.1.2 Bestimmung der Bindungsaffinitätsmessung S1P₁-Liganden mittels DMR

Die zu Beginn der Arbeit synthetisierten, fluoreszenzmarkierten und zum kovalent Labeling fähigen Oxadiazol-basierten S1P₁-Liganden, sowie einige Oxadiazol-Grundstrukturen wurden in einem label-free-BIND[®]-Assay der Firma SRU auf ihre S1P₁- (Abbildung 54 und Abbildung 55) und S1P₂-Bindungsaffinität (Abbildung 56) getestet (Prof. Scholich, Institut für Klinische Pharmakologie, Goethe-Universität). Die Liganden wurden dazu 30 min bei einer Konzentration von 1 μM mit stabil transfizierten, hS1P₁ bzw. hS1P₂ überexprimierenden CHO-Zellen inkubiert und die Verschiebung der Wellenlängen des reflektierten Lichts bestimmt. Daraus wurde, im Vergleich zu einer Inkubation mit S1P (0.1 μM) als natürliches Substrat, die prozentuale S1P-Aktivität errechnet. Als weitere Referenzsubstanz diente der S1P₁-Rezeptoragonist SEW2871 (62).

Die ermittelten Aktivitäten der getesteten Liganden am S1P₁- bzw. S1P₂-Rezeptor sind in Abbildung 54 und Abbildung 55 bzw. in Abbildung 56 gezeigt.

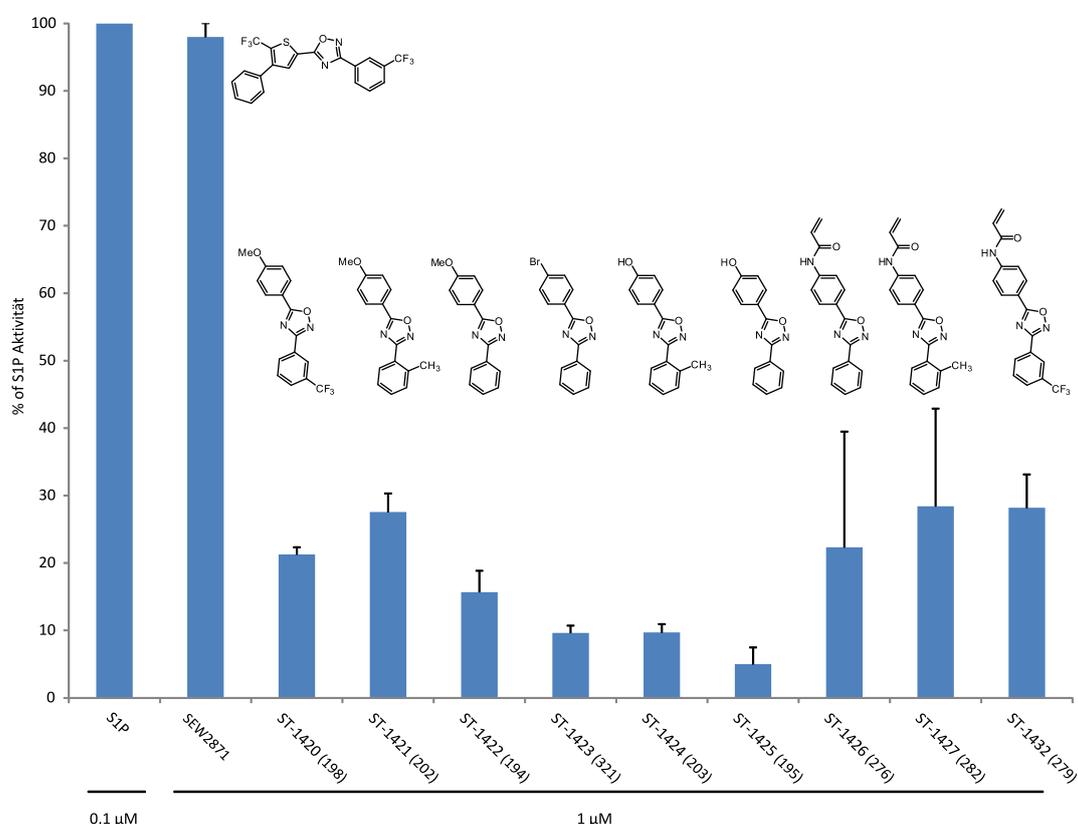


Abbildung 54: Prozentuale S1P-Aktivität der Oxadiazolgrundstrukturen (ST-1420 (198), ST-1421 (202), ST-1422 (194), ST-1423 (321), ST-1424 (203), ST-1425 (195)) und der Acrylamid-Oxadiazole (ST-1426 (276), ST-1427 (282), ST-1432 (279)) am hS1P₁-Rezeptor. Ermittelt an stabil transfizierten, S1P₁ überexprimierenden CHO-Zellen (n=2-3) durch Messung der dynamischen Masseumverteilung^[314]

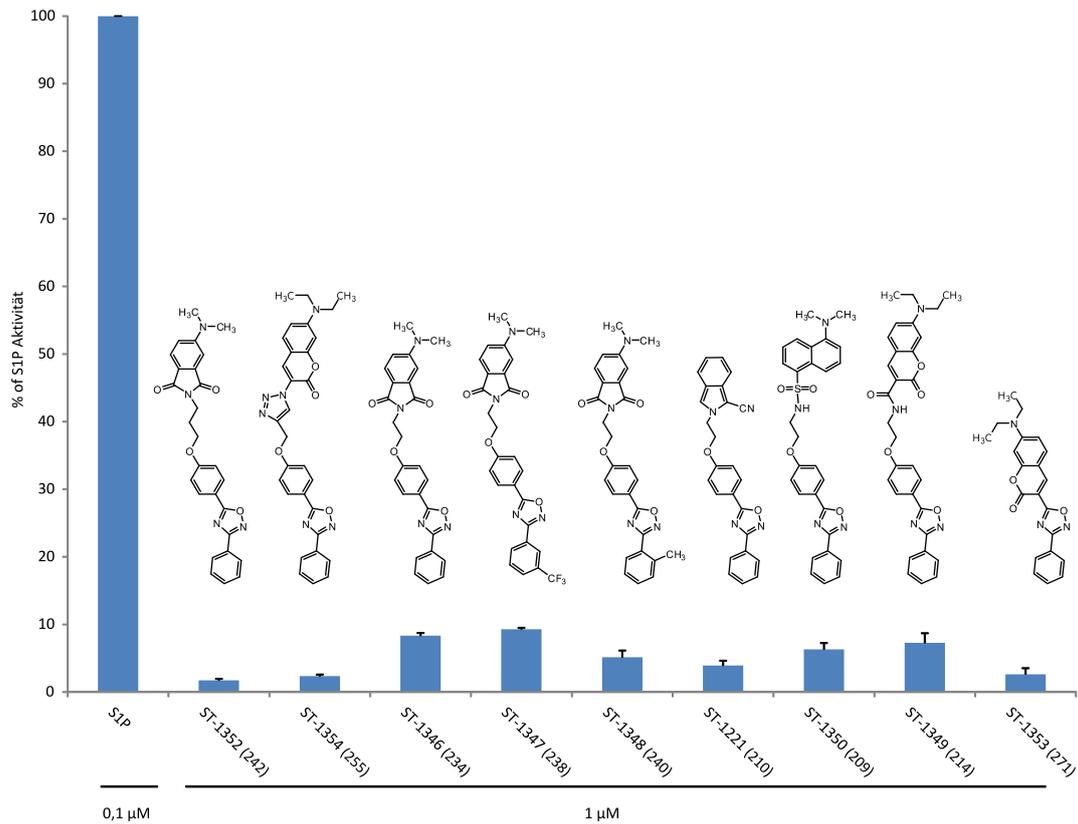


Abbildung 55: Fortsetzung von Abbildung 54: Prozentuale S1P-Aktivität der fluoreszenzmarkierten Oxadiazolliganden (ST-1352 (242), ST-1354 (255), ST-1346 (234), ST-1347 (238), ST-1348 (240), ST-1221 (210), ST-1350 (209), ST-1349 (214) und ST-1353 (271)) am S1P₁-Rezeptor. Ermittelt an stabil transfizierten, S1P₁ überexprimierenden CHO-Zellen (n=2) durch Messung der dynamischen Masseumverteilung mit^[314]

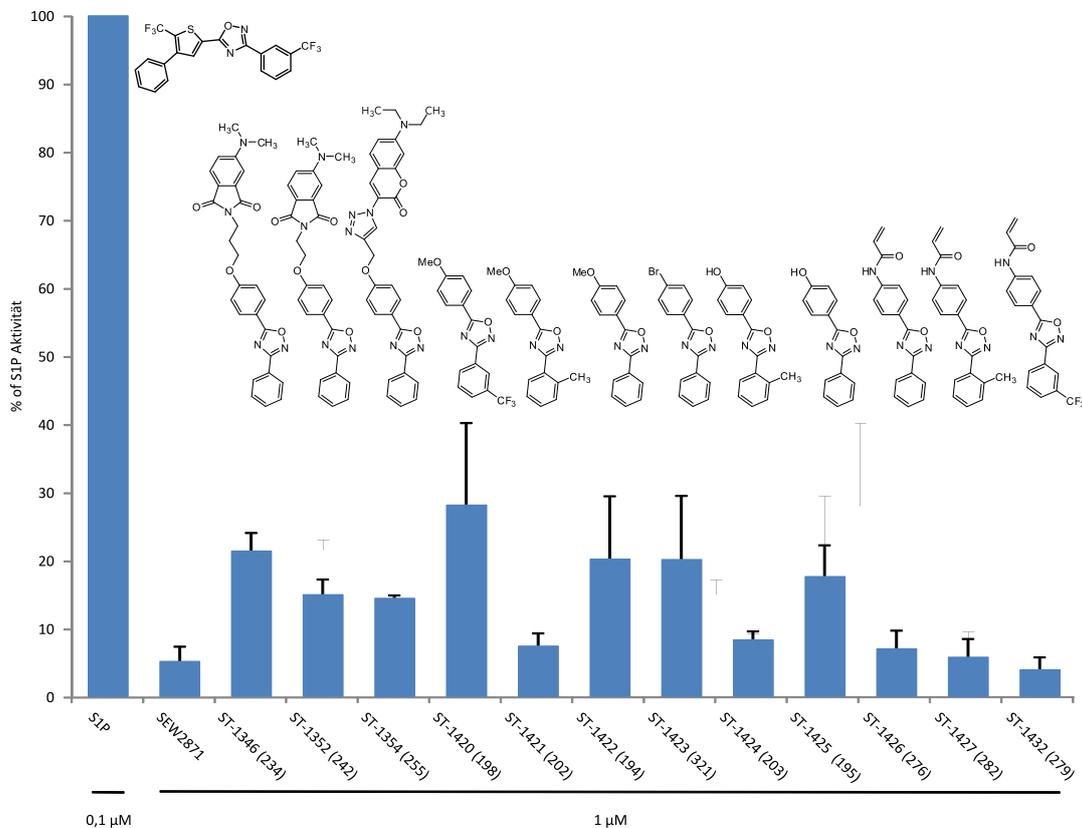


Abbildung 56: Prozentuale S1P-Aktivität einiger fluoreszenzmarkierten Oxadiazolliganden (ST-1346 (234), ST-1352 (242), ST-1354 (255)), der Oxadiazolgrundstrukturen (ST-1420 (198), ST-1421 (202), ST-1422 (194), ST-1423 (321), ST-1424 (203), ST-1425 (195)) und der Acrylamid-Oxadiazole (ST-1426 (276), ST-1427 (282), ST-1432 (279)) am S1P₂-Rezeptor. Ermittelt an stabil transfizierten, S1P₂ überexprimierenden CHO-Zellen (n=2) durch Messung der dynamischen Masseumverteilung mit^[314]

Die Ergebnisse zeigen, dass keine der getesteten Substanzen eine annähernd vergleichbare agonistische Affinität zum S1P₁-Rezeptor wie SEW2817 (**62**) aufweist. Die Oxadiazolgrundstrukturen erreichen zwischen 5% und 27% des Effektes den S1P bzw. SEW2817 (**62**) verursacht, wobei die Methylether (**ST-1420 (198)**, **ST-1421 (202)**, **ST-1422 (194)**) etwas höhere Werte erreichen. Die Messungen der zum kovalenten Labeling fähigen Derivate (**ST-1426 (276)**, **ST-1427 (282)**, **ST-1432 (279)**) ergab prozentuale S1P-Aktivitäten von ca. 25%, wobei die Messungen sehr fehlerbehaftet sind. Der, im Vergleich zu den anderen Messungen, relativ große Fehler kann auf Wechselwirkungen des Michael-Akzeptors mit dem Zellsystem zurückgeführt werden. Die Daten legen den Schluss nahe, dass die kovalenten Labeling fähigen Derivate **ST-1426 (276)** und **ST-1427 (282)** als partielle Agonisten am S1P₁-Rezeptor agieren.

Die fluoreszenzmarkierten Liganden (**ST-1352 (242)**, **ST-1354 (255)**, **ST-1346 (234)**, **ST-1347 (238)**, **ST-1348 (240)**, **ST-1221 (210)**, **ST-1350 (209)**, **ST-1349 (214)** und **ST-1353 (271)**) erreichen nur einen maximal Wert von 9% der S1P-Aktivität. Am S1P₂-Rezeptor hingegen sind die prozentualen S1P-Aktivitäten der drei gemessenen fluoreszenzmarkierten Derivate **ST-1352 (242)**, **ST-1346 (234)** und **ST-1354 (255)** deutlich höher (zwischen 14 und 21%) als am S1P₁-Rezeptor. Die Oxadiazolgrundstrukturen liefert vergleichbare Werte, wobei auch hier die Messung größere Fehler aufweist. Die Acrylamide **ST-1427 (282)** und **ST-1432 (279)** scheinen, unter Berücksichtigung des Fehlers, eine gewisse Selektivität gegenüber dem S1P₁-Rezeptor zu besitzen. Die am S1P₂-Rezeptor bestimmten prozentualen S1P-Aktivitäten sind nur ca. drei bis siebenmal so groß wie die am S1P₁-Rezeptor (4-7% verglichen mit 22-28%).

Diese erste Screening lieferte nur wenige, auswertbare Daten und konnten durch weitere Messungen bisher noch nicht verifiziert werden. Ob die synthetisierten Derivate bei Konzentrationen größer als 1 μ M oder bei längeren Inkubationszeiten eine höhere Aktivität aufweisen konnte daher nicht getestet werden. Zudem ist nicht bekannt, inwieweit das System bei Verwendung von fluoreszenzmarkierten Liganden verlässliche Daten liefert oder ob die Fluorophore die Messung stören können. Die optischen Daten des verwendeten Geräts^[426], wie detektierte bzw. detektierbare Wellenlängen bzw. Eigenschaften der Filter und Gitter, sind unbekannt.

Die ermittelten S1P-Aktivitäten deuten daraufhin, dass ein 3,5-Diphenyl-1,2,4-oxadiazol eine zu starke Vereinfachung der literaturbekannten, Oxadiazol-basierten S1P₁-Liganden darstellt. Daher wurde die Leitstruktur durch Einführung von zusätzlich Substituenten an der 3 Position des 5-Phenylrings (**ST-1627 (319)** und **ST-1628 (315)**) und durch die 4-Propansäurederivate am 3-Phenylring (**ST-1436 (297)** und **ST-1455 (302)**) verfeinert (vgl. Abbildung 50).

Diese Derivate wurden noch nicht auf ihr Bindungsverhalten am S1P₁- bzw. den anderen S1P-Rezeptoren untersucht. Es wurden jedoch Internalisierungsversuche mit Grün-Fluoreszierendem-Protein (GFP)-S1P₁ transfizierten HEK-293-Zellen vorgenommen.

5.1.3 Bestimmung der Liganden vermittelten Internalisierung von S1P₁-GFP

Durch die Bindung eines Liganden an den S1P₁-Rezeptor, kommt es neben der Aktivierung der Signalkaskade, auch zu einer Internalisierung des Rezeptors. Wird der Rezeptor mit einem Grün-Fluoreszierendem-Protein (GFP) gekoppelt, so kann die Internalisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.^[22]

Die Untersuchungen des Internalisierungsverhaltens der fluoreszenzmarkierten S1P₁-Liganden **ST-1628 (315)**, **ST-1627 (319)**, **ST-1436 (297)** und **ST-1455 (302)** wurden von Frau Dr. Katja Ihlenfeld (AK Stark + AK Prof. Meyer zu Heringdorf, Institut für Klinische Pharmakologie, Goethe-Universität) durchgeführt. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit GFP-S1P₁ transfiziert, für zwei Stunden mit den Liganden stimuliert (s. Seite 269) und unter dem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht (Abbildung 57).

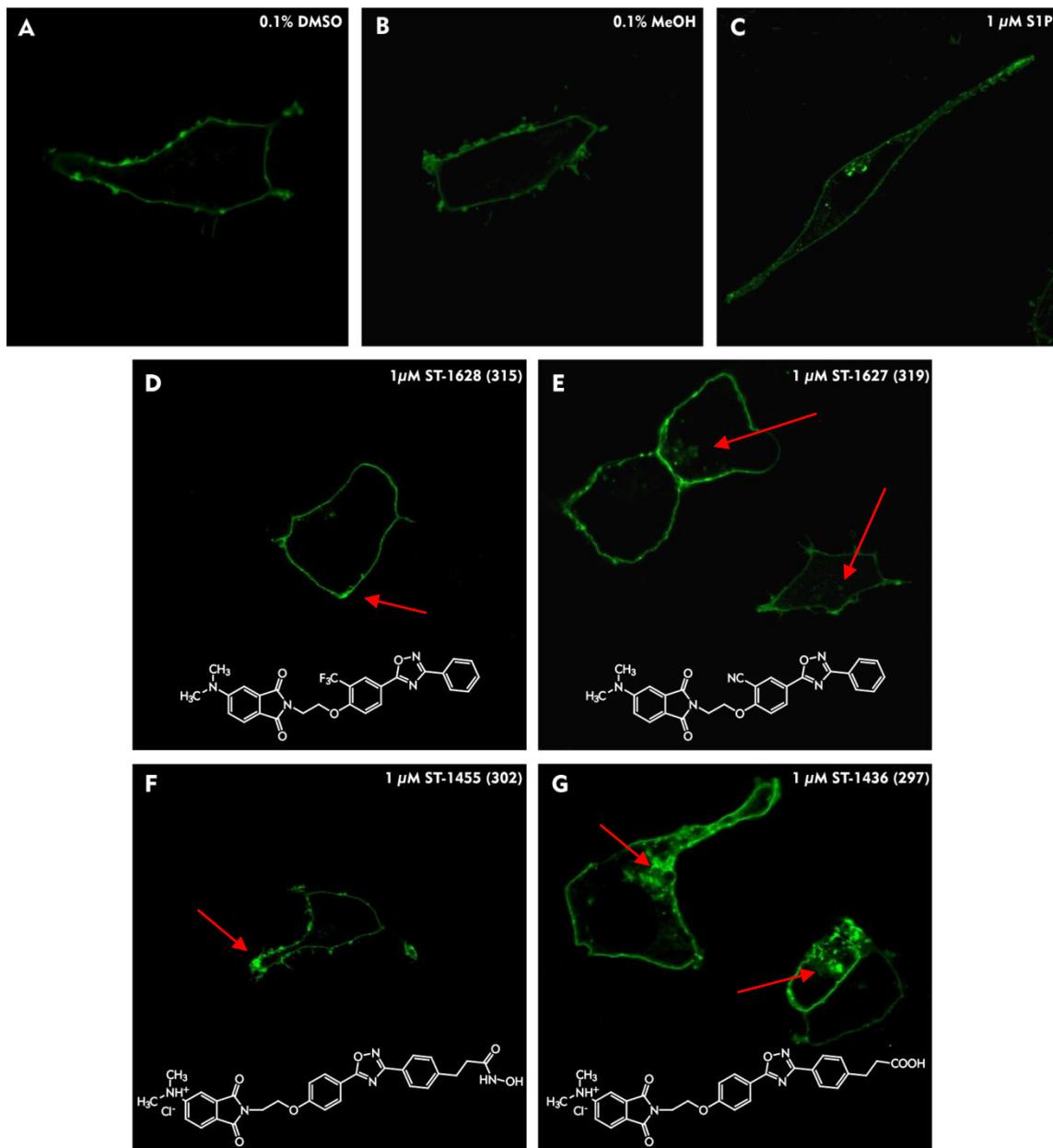


Abbildung 57: Laser-Scanning-Mikroskopbilder von GFP-S1P₁ transfizierten HEK-293-Zellen (A: DMSO-Kontrolle); (B: MeOH-Kontrolle); (C: 1 µM S1P als Referenz); (D-G: je 1 µM ST-1628 (315), ST-1627 (319), ST-1436 (297) und ST-1455 (302)) (Durchführung s. Seite 269)

In der DMSO- und Methanol-Kontrolle (Abbildung 57 A und B) ist deutlich zu erkennen, dass sich die S1P₁-Rezeptoren in der Zellmembran befinden. Durch Stimulation mit S1P werden sie internalisiert und liegen zum größten Teil im Zytosol der Zelle vor (Abbildung 57 C). Bei Stimulationen mit dem Trifluormethylderivat **ST-1628 (315)** (Abbildung 57 D) als auch mit dem Propanhydroxamsäurederivat **ST-1455 (302)** (Abbildung 57 F) sind keine Internalisierungen erkennbar. Die Rezeptoren bleiben in der Zellmembran lokalisiert, wohingegen in Abbildung 57 E, Stimulation mit dem Cyanoderivat **ST-1627 (319)**, eine leichte Internalisierung feststellbar ist. Das Propansäurederivat **ST-1436 (297)** zeigte eine deutliche, mit der von S1P vergleichbare, Internalisierung.

Da der S1P₁-Rezeptor nur durch Bindung bzw. Stimulation internalisiert wird^[22], kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die fluoreszenzmarkierte 3,5-Diphenyl-1,2,4-oxadiazolpropansäure **ST-1436 (297)** als auch das 2'-Cyano-3,5-Diphenyl-1,2,4-oxadiazol **ST-1627 (319)** an den S1P₁-Rezeptor agonistisch binden. Die Absorptionsmaxima der fluoreszenzmarkierten Liganden liegen bei 390 nm und unter 340 nm (vgl. 8.3. Absorptions- und Emissionsspektren Seite 264), weshalb eine Verfälschung bei der GFP-Lokalisation ausgeschlossen werden kann, da dieses bei 488 nm angeregt wurde und bei 508 nm emittiert.

5.1.4 Beeinflussung der S1P₅-vermittelten Expression von CTGF durch ST-1715 – ST-1719

Die synthetisierten Liganden **ST-1715 – ST-1719** wurden auf ihr Verhalten bezüglich der S1P₅-vermittelten Expression von CTGF (*connective tissue growth factor*) in humanen Mesangialzellen (Blutgefäßzellen um die Nieren) untersucht, da vermutet wird, dass die pro-fibrotische Wirkung von extrazellulärem S1P durch den S1P₅-Rezeptor vermittelt wird.^[427] Die Ergebnisse werden von C. Wünsche und A. Koch *et al.* publiziert.

5.2 5-LO-Inhibitoren

5.2.1 Bestimmung der Inhibition der 5-LO-Produktbildung

Alle synthetisierten 5-LO-Inhibitoren wurden von Frau Carmen Rödl, unter Betreuung von Frau Dr. Bettina Hofmann im Arbeitskreis von Prof. Steinhilber, auf ihr Vermögen die Bildung der 5-LO-Produkte zu hemmen untersucht. Dabei wurde die Menge an gebildetem Leukotrien B₄ (LTB₄), seines *all trans*-Isomers und an 5-H(P)ETE im Vergleich zu einer Kontrolle per HPLC bestimmt. Die Menge an CysLT und den Oxidationsprodukten von LTB₄ wurde nicht bestimmt.^[428] Die Messungen wurden jeweils in einem zellbasierten (intakten Polymorphonukleare Leukozyten (PMNL)) und einem zellfreien (S100 = 100000 x g Überstand von PMNL Homogenaten) Testsystem durchgeführt. Durch den S100-Assay kann festgestellt werden, ob die 5-LO-Produktbildung durch Inhibition der 5-LO gehemmt wird oder ob die Testsubstanzen ein der 5-LO vorgelagertes Enzyme, wie zum Beispiel FLAP oder cPLA₂, inhibieren. (Durchführung vgl 8.4 Pharmakologische Testung, S. 269)^[249]

PMNL-ASSAY

Aus dem Blut von freiwilligen Spendern wurden polymorphonukleare Leukozyten (PMNL) isoliert^[429] in PBS-Puffer aufgenommen und mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Durch Zugabe von Calcium-Ionophore und Arachidonsäure wurde die 5-LO aktiviert und die Reaktionsprodukte (LTB₄, *all trans*- LTB₄ und 5-H(P)ETE) wurden nach 10 Minuten extrahiert und per HPLC analysiert.^[249]

S100-ASSAY

Hierzu wurde der Überstand aus frisch isolierten, durch Ultraschall homogenisierten und bei 100,000 g zentrifugierten PMNL zur Testung der Inhibition der 5-LO-Produktbildung verwendet. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog zum PMNL-Assay.^[249]

5.2.2 Toxizitätsmessungen

Zur Beurteilung der Toxizität ausgewählter Inhibitoren wurden diese in einem WST-1-Zellviabilitätsassay^[430] und einem Lactatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsassay^[431] untersucht, wobei jeweils Rev-5901 als zytotoxische Kontrolle verwendet wurde. Beide Assays wurden von Frau Brüggerhoff mit humanen, leukämischen, monozytischen U937-Zellen durchgeführt.

WST-1-Assay

Der WST-1-Assay (water soluble tetrazolium) misst colorimetrisch die Anzahl an mitochondrial, metabolisch aktiven Zellen. In solchen Zellen wird das zugegebene WST-1 (Dinatrium mono(4-(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazol-3-ium-5-yl)benzol-1,3-disulfonat)) durch die Succinat-Tetrazolium-Reduktase, die Teil der mitochondrialen Atmungskette ist, in das dunkelrote Formazan umgewandelt, dass dann colorimetrisch bestimmt wird. Eine verringerte Bildung von Formazan, verursacht durch die Inhibition der Zellviabilität, kann dabei sowohl zytotoxische als auch anti-proliferative Gründe haben.^[430]

U937-Zellen wurden für 48 Stunden zusammen mit den ausgewählten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen und WST-1 inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 420-480 nm im Vergleich zu einer 100% Kontrolle (Rev-5901) mit einem Tecan-Reader gemessen (infinite M200, Tecan Group Ltd, Crailsheim, Germany).^[249]

LDH-Assay

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein zytosolisches Enzym, das in allen Zellen vorkommt. Ist die Zellmembran durch zytotoxische Substanzen zerstört, kann sie die Zelle verlassen. Die LDH-Aktivität wird ebenfalls durch die Reduktion von 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazol-3-iumchlorid nachgewiesen werden. Durch den LDH-Assay kann zwischen nekrotischer und anti-proliferativer Zytotoxizität unterschieden werden, wobei ein erhöhter LDH-Ausfluss nekrotische Zytotoxizität bzw. den Verlust der Zellmembranintegrität bedeutet.^[431]

U937-Zellen wurden für 48 Stunden mit den ausgewählten Substanzen (30 μ M) inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen wurden ein Aliquot des Überstands gemäß dem Assayherstellerprotokoll behandelt und die Absorption bei 490 nm mit einem Tecan-Reader gemessen (infinite M200, Tecan Group Ltd, Crailsheim, Germany). Die LDH-Freisetzung wurde dabei im Vergleich zu einer 100% Kontrolle (Rev-5901) in Prozent angegeben.^[249]

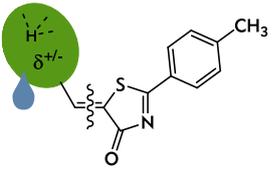
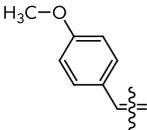
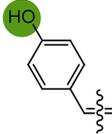
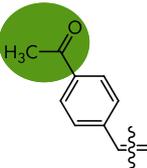
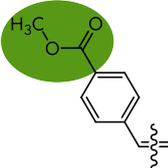
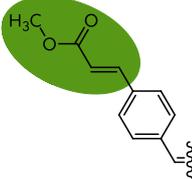
5.2.3 Inhibition der 5-LO-Produktbildung der synthetisierten Substanzen in PMNL- und S100-Assay

5.2.3.1 Polare Substituenten am 5-Aryliden-Rest

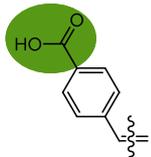
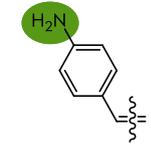
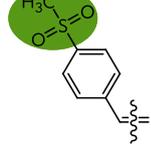
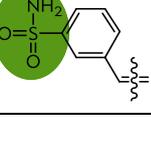
Um die bestehenden Struktur-Aktivitätsbeziehungen^[225,249] der 5-Aryliden-2-aryl-thiazolone zu erweitern, wurden am 5-Phenylring polare Substituenten mit unterschiedlichen elektronischen und Wasserstoff-Brückenbindungseigenschaften eingeführt, die zudem die Löslichkeit im Wässrigen erhöhen sollten.

Tabelle 3 zeigt die synthetisierten Verbindungen mit den IC₅₀-Werten der 5-LO-Produktbildung in S100- und PMNL-Assays^[249], den experimentell bestimmten Löslichkeiten sowie kalkulierten logP-Werten (clogP)^[356,357] und der kalkulierten Löslichkeit (clogS)^[356]. Die jeweils verwendete Methode zur Berechnung der clogP- und clogS-Werte nutzen ein atombasiertes Inkrementensystem, das den Beitrag einer unterschiedlichen Anzahl an Atomen addiert. Jede Methode wurde dabei mit verschiedenen experimentellen Daten mehrere Tausend Verbindungen trainiert und validiert.^[356,357]

Tabelle 3: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] der 5-Aryliden-2-aryl-thiazolone mit polaren Substituenten am 5-Phenylring, experimentell bestimmte Löslichkeiten sowie berechnete logP_{356,357} und logS-Werte^[356].

Code (Substanz nr.)		IC ₅₀ [μM] (95% Konfidenz- intervall, n≥3)		Löslichkeit		clogP _[357]	clogS _[356]
		S100	PMNL	in DMSO [mM]	in PBS (1% DMSO) [μM]	_[356]	
C06 (182)		0.30	0.66	10	30	3.69 3.78	-5.24
ST-1683 (343)		0.33 (0.22- 0.49)	1.13 (0.85- 1.49)	50	30	3.10 3.59	-4.93
ST-1699 (344)		0.16 (0.12- 0.22)	0.58 (0.44- 0.78)	5	30	3.21 3.81	-5.91
ST-1685 (345)		0.16 (0.12- 0.21)	0.69 (0.49- 0.95)	10	30	3.76 3.86	-5.37
ST-1689 (346)		0.18 (0.09- 0.34)	3.61 (2.15- 6.10)	5	30	4.09 3.99	-5.74

5.2.3.1 Polare Substituenten am 5-Aryliden-Rest

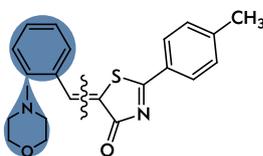
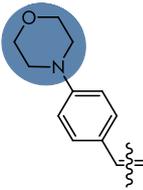
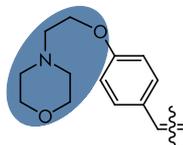
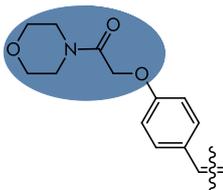
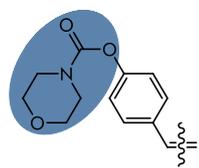
ST-1684 (350)		1.46 (1.00- 2.13)	8.36 (6.20- 11.29)	10	100	3.51 3.41	-5.24
ST-1498 (349)		0.58 (0.35- 0.97)	1.33 (0.91- 1.95)	50	10	2.54 3.17	-5.30
ST-1634 (347)		0.19 (0.10- 0.37)	5.29 (1.28- 21.88)	10	10	2.13 2.95	-5.64
ST-1742 (348)		0.25 (0.21- 0.30)	1.44 (1.33- 1.55)	30	80	1.93 2.50	-5.13

Das C06-Hydroxyanalogon **ST-1683 (343)** mit seinem zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Donor weist im zellfreien Assay ein identisches inhibitorisches Potential wie **C06** auf, wobei der IC_{50} -Wert im zellbasierten Assay fast doppelt so groß wie der von **C06** ist. Die elektronenärmeren Derivate **ST-1699 (344)**, **ST-1685 (345)** und **ST-1689 (346)** mit verschobenen Wasserstoffbrücken-Akzeptoren weisen im S100-Assay ein höheres inhibitorisches Potential auf (IC_{50} -Werte zwischen 0.16 und 0.18 μM verglichen mit 0.33 μM für **C06**), bei gleicher Löslichkeit im Wässrigen. Im zellulären Milieu ist die Inhibition des Acetylderivates **ST-1699 (344)**, und des Methyl-esters **ST-1685 (347)** vergleichbar mit der von **C06**, wohingegen der IC_{50} -Wert des Zimtsäure-ester **ST-1689 (346)** deutlich höher liegt, was durch Wechselwirkungen mit dem Michael-Akzeptorsystem verursacht werden kann. Die in Puffer deutlich besser lösliche Benzoesäure Verbindung **ST-1684 (350)**, die unter Assaybedingungen vermutlich deprotoniert vorliegt, weist in beiden Assaysystemen ein deutlich schlechteres Inhibitionspotential auf. Das elektronenreiche Anilin **ST-1498 (349)** mit seinen zwei Wasserstoffbrücken-Donoren zeigt etwas höhere IC_{50} -Werte als das vergleichbare Phenol **ST-1683 (343)**. Das inhibitorische Potential des elektronenärmeren, weniger lipophilen Sulfons **ST-1634 (347)** liegt an der isolierten 5-LO im Bereich der anderen elektronenarmen Derivate ($IC_{50}(S100) = 0.19 \mu M$), wohingegen es im zellbasierten Assay um ca. den Faktor 30 geringer ist. Das zum Teil deutlich verringerte Inhibitionspotential einiger **C06**-Derivate im zellbasierten Assay kann mit einer schlechten Bioverfügbarkeit innerhalb der Zelle bzw. einer verminderte Fähigkeit die Zellmembran zu überqueren zusammenhängen, obwohl die $clogP$ -Werte bzw. die $clogS$ dies nicht vermuten lassen. Eine konkurrierende Bindung an anderen Zellbestandteilen ist ebenfalls nicht auszuschließen. Ein ähnliches Verhalten wie **ST-1634** zeigt auch das Sulfonamid **ST-1742 (348)** mit IC_{50} -Werten von 0.25 μM und 1.44 μM im S100 bzw. PMNL Assay, wobei die Löslichkeit in Puffer fast dreimal größer ist als die von **C06**.

5.2.3.2 Morpholinoderivate

Das inhibitorische Potential der als besser wasserlöslich geltenden^[334,335], synthetisierten Morpholinderivate ist in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] der Morpholin-C06-Derivate, experimentell bestimmt Löslichkeiten.

Code (Substan- znr.)		IC ₅₀ [μ M] (95% Konfidenz- interval, n \geq 3)		Löslichkeit		clogP <small>[357]</small>	clogS <small>[356]</small>
		S100	PMNL	in DMSO [mM]	in PBS (1% DMSO) [μ M]	<small>[357]</small>	<small>[356]</small>
ST-1633 (366)		1.07 (0.73- 1.58)	3.65 (0.88- 15.21)	10	10	3.27 3.22	-5.33
ST-1499 (361)		0.52 (0.35- 0.77)	2.33 (1.82- 2.98)	10	30	3.39 3.81	-4.73
ST-1639 (370)		0.73 (0.47- 1.13)	1.66 (1.17- 2.35)	20	50	2.99 3.00	-4.72
ST-1640 (364)		0.33 (0.27- 0.40)	0.74 (0.52- 1.05)	10	50	2.97 3.75	-5.41

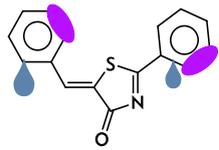
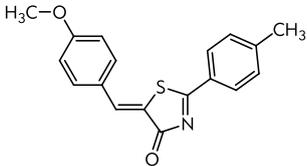
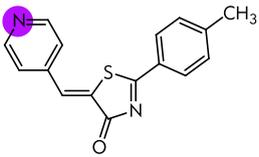
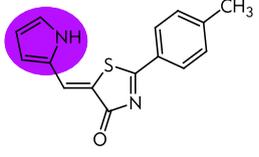
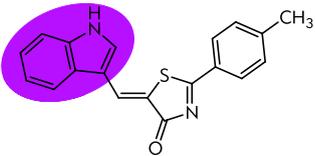
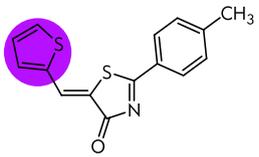
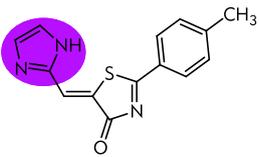
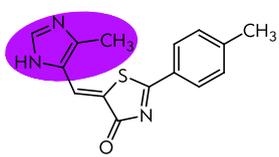
Das 4-Morpholinophenyl-C06-Derivat **ST-1633 (366)** zeigt, unter zellfreien Bedingung, ein dreifach geringeres inhibitorisches Potential als **C06** bei einer verminderten Löslichkeit in Puffer. **ST-1499 (361)**, das Ethoxyanalog, weist keine Verbesserung der IC₅₀-Werte auf. Die Löslichkeit entspricht der von **C06** (vgl. Tabelle 3), obwohl der clogS-Wert höher ist. Die Morpholinoxyethylverbindung **ST-1639 (370)** ist in höheren Konzentrationen als **C06** in DMSO und in Puffer löslich. Im zellbasierten Assay weisen alle drei Morpholinderivate eine deutlich reduzierte Inhibition der 5-LO-Produktbildung im Vergleich zu **C06** auf.

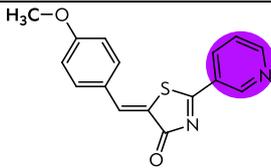
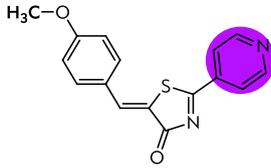
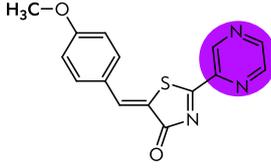
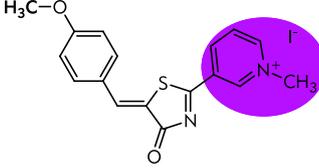
Die IC₅₀-Werte des Morpholincarbamates **ST-1640 (364)** sind mit denen des C06-Phenols **ST-1683 (343)** vergleichbar, wobei **ST-1640 (364)** eine gesteigerte Pufferlöslichkeit besitzt. **ST-1640 (364)** kann als Prodrug des Phenols angesehen werden, was das ähnliche inhibitorische Potential erklären könnte.

5.2.3.3 Heteroaryl Aryliden-Aryl-Thiazolone

Durch die Einführung der polaren Gruppen bzw. der Morpholinsubstituenten konnte nicht die Löslichkeit gesteigert und gleichzeitig das inhibitorische Potential aufrechterhalten werden. Die verschiedenen synthetisierten Derivate spiegeln die bereits beobachtete, kontinuierliche SAR^[225,249] wieder. Wegen ihrer niedrigeren, berechneten Lipophilie (clogP) und Löslichkeit (clogS) wurden die in Tabelle 5 gezeigten heterozyklischen Aryliden-Aryl-Thiazolone synthetisiert, die Inhibition der 5-LO-Produktbildung untersucht und die Löslichkeiten bestimmt.

Tabelle 5: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] der heterozyklischen Aryliden-Aryl-Thiazolone, experimentell bestimmte Löslichkeiten, berechnete logP-Werte^[356,357] und berechnete Löslichkeit (clogS)^[356].

Code (Substanz nr.)		IC ₅₀ [μ M] (95% Konfidenz- intervall, n \geq 3)		Löslichkeit		clogP _[357]	clogS _[356]
		S100	PMNL	in DMSO [mM]	in PBS (1% DMSO) [μ M]	_[356]	
C06 (182)		0.30	0.66	10	30	3.69 3.78	-5.24
ST-1632 (380)		0.33 (0.27- 0.40)	2.19 (1.72- 2.81)	5	50	2.27 2.81	-3.23
ST-1629 (377)		0.28 (0.21- 0.37)	1.24 (1.05- 1.47)	10	80	2.27 2.81	-3.23
ST-1630 (381)		8.02 (5.50- 11.71)	1.58 (1.13- 2.19)	10	10	2.37 2.67	-3.07
ST-1702 (379)		> 3.00	1.07 (0.71- 1.59)	25	3	3.75 4.06	-5.78
ST-1740 (378)		0.86 (0.64- 1.15)	0.98 (0.80- 1.20)	15	30	3.41 3.73	-5.24
ST-1637 (382)		2.69 (2.00- 3.62)	6.09 (4.23- 8.69)	20	10	1.60 1.82	-3.33
ST-1686 (383)		6.04 (4.12- 8.78)	14.89 (11.75- 18.86)	30	10	1.87 2.45	-4.43

ST-1638 (386)		0.96 (0.77- 1.20)	2.66 (1.94- 3.64)	5	30	1.69 2.39	-4.11
ST-1641 (385)		0.44 (0.36- 0.54)	2.99 (2.41- 3.72)	10	10	1.69 2.39	-4.11
ST-1755 (384)		0.30 (0.22- 0.42)	2.87 (2.13- 3.85)	20	30	0.73 1.42	-3.33
ST-1687 (387)		4.62 (3.20- 6.67)	> 30	100	1000	-3.15 n.a.	n.a

Die beiden elektronenarmen Pyridine **ST-1632 (380)** und **ST-1629 (377)** zeigen unter zellfreien Bedingungen ähnliche Aktivitäten wie **C06**. Die Position des Wasserstoffbrücken-Akzeptors scheint dabei nur einen marginalen Einfluss zu haben. Die in PMNL bestimmten Aktivitäten sind, bei höherer Löslichkeit in Puffer, wiederum deutlich höher. Beide Verbindungen besitzen eine verminderte berechnete Lipophilie und eine höhere Löslichkeit. Der Pyrrolheterozyklus **ST-1630 (381)**, der nur einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor und keinen Donor aufweist, zeigt genauso wie das größere Indolanalogon **ST-1702 (379)** ein sehr geringes 5-LO-Inhibitions-potential im S100-Assay und ein moderates in intakten Zellen. Die höheren Aktivitäten im zellbasierten Assay lassen vermuten, dass beide Derivate die 5-LO indirekt z.B. durch Inhibition eines in der Leukotriensynthese vorgeschalteten Enzyms, wie FLAP, inhibieren. Trotz eines geringeren clogP-Wertes ist das Pyrrol **ST-1630 (381)** schlechter im Puffer löslich als **C06**.

Durch Vergleich des Thiophens **ST-1740 (378)** mit dem Pyrrol **ST-1630 (381)** wird die Notwendigkeit eines Wasserstoffbrücken-Akzeptors für die direkte 5-LO-Inhibition deutlich. Das Thiophenderivat **ST-1740 (378)** besitzt im S100-Assay einen um eine Zehnerpotenz niedrigen IC_{50} -Wert ($0.86 \mu M$) als das Pyrrol ($8.02 \mu M$). Im PMNL-Assay weisen beide Substanzen ähnliche Werte auf. Das inhibitorische Potential der beiden Imidazole **ST-1637 (382)** und **ST-1686 (383)** liegt mit IC_{50} -Werten von $2.69 \mu M$ und $6.04 \mu M$ zwischen denen des Thiophens und des Pyrrols, da sie sowohl einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor als auch einen Donor aufweisen. Die Methylgruppe in **ST-1686 (383)** schmälert zudem das Inhibitionspotential im zellbasierten Assay ($IC_{50} = 14.89 \mu M$ verglichen zu $6.09 \mu M$ von **ST-1637 (382)**), was auf eine schlechte Zellgängigkeit hindeutet bzw. auf sterische Behinderung der „Wasserstoffbrücken-Donor/Akzeptor-Rotation“. Trotz geringerer clogP- und clogS-Werte zeigen alle Fünfring Aryliden-Aryl-Thiazolone eine geringere Löslichkeit in Puffer als **C06**.

Die stickstoffhaltigen 2-Heteroaryl-thiazolone **ST-1638 (386)**, **ST-1641 (385)** und **ST-1755 (384)**, zeigen in beiden Assaysystemen ähnliche inhibitorische Aktivitäten wie die entsprechenden 5-Heteroaryl-Thiazolon-Analoga **ST-1632 (397)** und **ST-1629 (377)**, wobei auch hier die zellbasierten IC_{50} -Werte deutlich höher sind. Unter zellfreien Bedingungen scheint der Stickstoff in der 4-Position gegenüber der 3 bevorzugt zu sein. Der IC_{50} -Wert für **ST-1638 (386)** ist doppelt

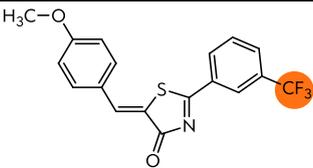
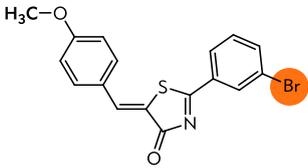
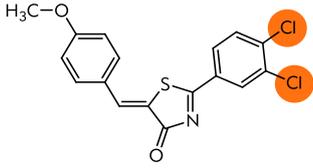
so groß wie von **ST-1641 (385)**, wobei die 2,5-Anordnung im Pyrazin **ST-1755 (384)** in einem noch geringeren IC_{50} -Wert von $0.3 \mu M$ resultiert. Trotz deutlich niedrigerer Lipophilie ist die Löslichkeit aller drei 5-Heteroaryl-Thiazolone in Puffer nicht höher. Das methylierte Pyridiniumsalz **ST-1687 (387)** weist eine inhärent hohe Löslichkeit auf, zeigt aber nur noch eine schwache 5-LO-Aktivität im zellfreien und keinerlei Aktivität im zellbasierten Assay.

Die Heteroaryl-**C06**-Serie zeigt zum einen, dass die berechneten, im Vergleich zu **C06** niedrigeren $clogP$ - und $clogS$ -Werte, nicht in einer besseren tatsächlichen Löslichkeit resultieren. Zum anderen weisen die Heterozyklen untereinander keine ausgeprägte, kontinuierliche SAR auf, was sich auch in der Bedeutung eines Wasserstoffbrücken-Akzeptors zeigt. Die Position des Heterozyklus am Thiazolon scheint dabei keine wesentliche Rolle zu spielen. Wie auch die polaren Strukturen aus Tabelle 3 zeigen die im Wässrigen gut bzw. besser löslichen Heteroaryl-Thiazolone, wie **ST-1687 (387)** oder **ST-1632 (380)**, im zellbasierten Assay deutlich höhere IC_{50} -Werte als im S100-Assay.

5.2.3.4 Substituierte und zum kovalenten/Photoaffinity-Labeling fähige Aryliden-Aryl-Thiazolone

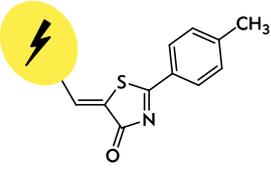
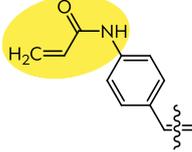
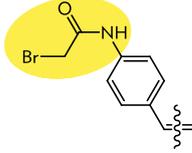
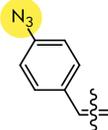
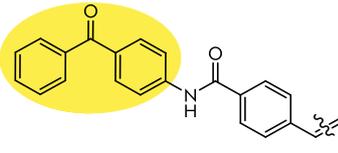
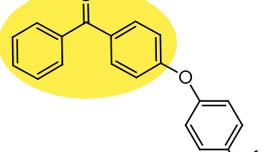
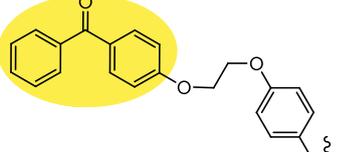
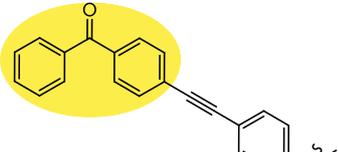
Die in Tabelle 6 und Tabelle 7 gezeigten, lipophilen Halogen-/Trifluormethyl-, zum kovalenten und Photoaffinity-Labeling fähigen Derivate weisen das in den beiden SAR-Studien^[225,249] gezeigte, typische Verhalten der meisten Aryliden-Aryl-Thiazolone auf: Sie besitzen niedrige IC_{50} -Werte, die im zellbasierten Assay nur geringfügig höher sind als unter zellfreien Bedingungen. Das Substitutionsmuster bzw. der Substituent am 2-Arylrest der in Tabelle 6 gezeigten Aryliden-Aryl-Thiazolone hat keinen wesentlichen Einfluss auf die IC_{50} -Werte. Sie liegen um die $0.1 \mu M$ im S100 und zwischen $0.39 \mu M$ und $0.59 \mu M$ im zellbasierten Assay.

Tabelle 6: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] der Halogen- / Trifluormethyl substituierten **C06**-Derivate **ST-1696 - ST-1698 (374 - 376)**.

Code (Substanznr.)	Struktur	IC_{50} [μM] (95% Konfidenzintervall, $n \geq 3$)	
		S100	PMNL
ST-1696 (374)		0.15 (0.12-0.18)	0.59 (0.48-0.72)
ST-1697 (375)		0.07 (0.05-0.11)	0.39 (0.31-0.51)
ST-1698 (376)		0.18 (0.11-0.30)	0.61 (0.44-0.84)

Das zum kovalenten Labeling-fähige Acrylamid **ST-1500 (388)**, Bromketon **ST-1631 (389)** und das Azid **ST-1692 (391)**, zeigen eine gute bis sehr gute, submicromolare Inhibition der 5-LO-Produktbildung in beiden Assaysystemen (Tabelle 7). Der etwas höhere IC_{50} -Wert von **ST-1631 (389)** im PMNL-Assay kann auf unspezifische Reaktionen des reaktiven α -Bromketons zurückgeführt werden.

Tabelle 7: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] der zum kovalenten und zum Photoaffinity-Labeling fähigen C06-Derivate.

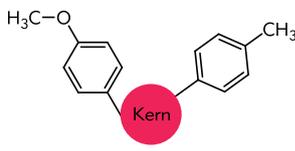
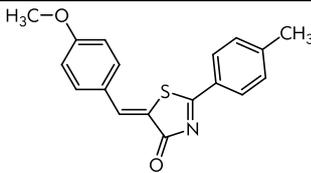
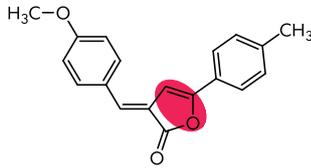
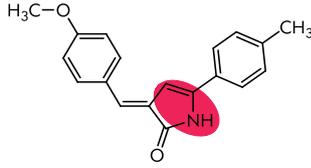
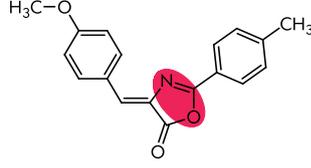
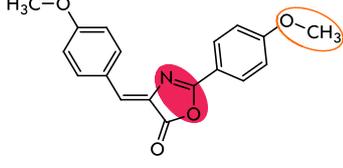
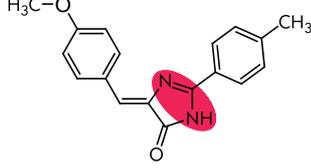
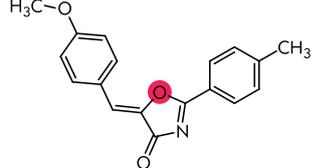
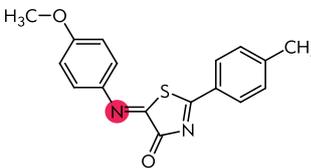
Code (Substanz nr.)		IC ₅₀ [μM] (95% Konfidenz- intervall, n≥3)	
		S100	PMNL
ST-1500 (388)		0.22 (0.14- 0.35)	0.8 (0.57- 1.13)
ST-1631 (389)		0.27 (0.20- 0.37)	2.77 (2.12- 2.81)
ST-1692 (391)		0.07 (0.05- 0.08)	0.68 (0.38- 1.21)
ST-1694 (394)		0.05 (0.03- 0.09)	0.95 (0.64- 1.42)
ST-1701 (398)		0.06 (0.05- 0.08)	0.31 (0.24- 0.38)
ST-1695 (401)		0.22 (0.12- 0.38)	1.66 (0.75- 3.68)
ST-1743 (406)		n.b	n.b.

Die sehr lipophilen, voluminösen Benzophenonderivate besitzen sehr niedrige IC₅₀-Werte sowohl im zellulären Assay auch als unter zellfreien Bedingungen. Sie geben ein typisches Verhalten von 5-LO-Inhibitoren wieder: gesteigerte Lipophilie führt zu höher Aktivität.^[225,249,251] Im Falle des alkinverknüpften Derivats **ST-1743 (406)** ist die Löslichkeit im DMSO zu gering, um die 5-LO-Inhibition bestimmen zu können. Die anderen, verschiedenartig verknüpften Derivate **ST-1694 (394)**, **ST-1701 (398)** und **ST-1695 (401)** zeigen IC₅₀-Werte zwischen 0.03 - 0.3 μM im S100-Assay bzw. 0.3 - 1.25 μM unter zellulären Bedingungen. Alle Derivate eignen sich aufgrund ihrer guten bis sehr guten Affinität zur 5-LO zum kovalenten bzw. Photoaffinity-Labeling.

5.2.3.5 Kernvariationen

Da sowohl die Heteraryl- (Tabelle 5) als auch die polareren und Morpholin-C06-Derivate (Tabelle 3 und Tabelle 4) die kontinuierliche SAR widerspiegeln, wurden grundlegendere Veränderungen am Thiazolonkern in Form des Austausches einzelner Elemente durchgeführt. Die verschiedenartigen C06-Kernvariationsderivate sind mit ihren 5-LO-Aktivitäten in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] der C06-Kernvariationsderivate

Code (Substanz nr.)		IC ₅₀ [μM] (95% Konfidenz- interval, n≥3)	
		S100	PMNL
C06 (182)		0.30	0.66
ST-1501 (409)		> 30	> 30
ST-1636 (410)		11.78 (7.25- 19.14)	10.28 (5.23- 18.12)
ST-1745 (414)		> 30	> 30
ST-1744 (417)		> 30	> 30
ST-1746 (415)		7.80 (3.95- 15.42)	1.95 (1.52- 2.49)
ST-1750 (424)		1.86 (1.35- 2.54)	10.51 (6.99- 15.79)
ST-1693 (432)		8.22 (5.39- 12.54)	10.32 (6.93- 15.38)

ST-1690 (433)		> 30	> 30
ST-1691 (434)		> 30	> 30
ST-1751 (438)		> 30	2.90 (2.15-3.91)
ST-1754 (443)		> 30	> 30
ST-1753 (444)		> 30	> 30
ST-1749 (450)		> 30	0.94 (0.61-1.44)

Das Furanon **ST-1501 (409)** und das Pyrrolon **ST-1636 (410)** machen deutlich, dass der Schwefel im Thiazolonkern essentiell für die 5-LO-Aktivität ist. Beide Kernvariationen sind sowohl im S100- als auch im PMNL-Assay nicht aktiv bzw. haben IC_{50} -Werte von größer $10 \mu M$ (**ST-1636 (410)**). Auch die beiden Oxazol-5-on-Derivate **ST-1745 (414)** und **ST-1744 (417)**, die an der 3-Position des Kernrings einen Wasserstoffbrücken-Donor in Form des Stickstoffs besitzen, können die 5-LO-Produktbildung nicht inhibieren. Im Gegensatz dazu weist das Imidazolon **ST-1746 (415)** eine gewisse inhibitorische Aktivität auf, die jedoch auf eine indirekte Inhibition hindeutet (der IC_{50} -Wert im S100-Assay ist deutlich höher im PNML-Assay). Der alleinige Austausch des Schwefels im Thiazolon (**ST-1750 (424)**) führt zu einem deutlichen Verlust an Aktivität in beiden Assaysystemen. Das Oxa-C06 Derivat weist IC_{50} -Werte von $1.86 \mu M$ im S100 und $10.51 \mu M$ im PMNL auf (vgl. $0.3 \mu M$ und $0.66 \mu M$ für **C06**). Das größere Schwefelatom und die dadurch bedingten Geometrie des Thiazolonrings scheinen für eine potente Inhibition der 5-LO-Produktbildung wichtig zu sein. Um den Einfluss des Benzylidenkohlenstoffs zu untersuchen, wurde er durch Stickstoff ersetzt (**ST-1693 (432)**), was zu einem Aktivitätsverlust mit IC_{50} -Wert um $10 \mu M$ führt. Wird die Konjugation des aromatischen Systems durch Addition von Methanol an das Imin unterbrochen und damit auch die Geometrie verändert (**ST-1690 (433)**), geht dies

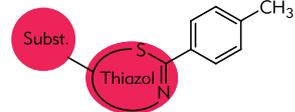
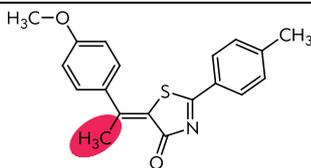
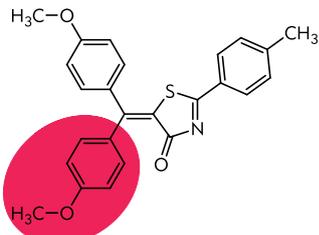
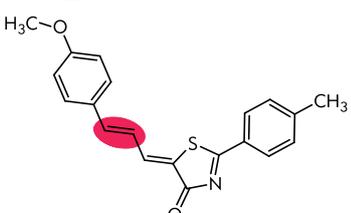
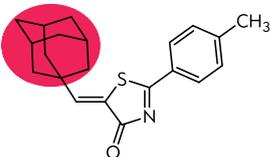
mit einem kompletten Verlust der Aktivität einher. Das durch Addition von Methanol und Umlagerung entstandenen Hydroxythiadiazin-4-on **ST-1691 (434)** ist ebenfalls inaktiv. In **ST-1751 (438)** ist zwischen Thiazolon und 3-Arylrest ein zusätzlicher Stickstoff vorhanden. Die Änderung der Konformation und die Flexibilität, die durch das Gleichgewicht zwischen dem Amin und Imintautomer entsteht, führen zu einem Verlust der 5-LO-Aktivität. Der micromolare IC_{50} -Wert ($2.90 \mu M$) im zellbasierten Assay deutet auf eine indirekte oder unspezifische Inhibition der 5-LO durch **ST-1751 (438)**.

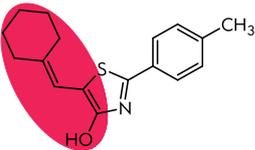
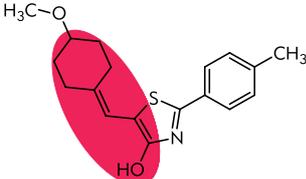
Der Wechsel zu einer 2,5-substituierten 2-Thioxo-thiazolidingrundstruktur führt zu 5-LO inaktiven Verbindungen (**ST-1754 (443)** und **ST-1753 (444)**), was auf die veränderte Geometrie der Moleküle zurückgeführt werden kann. Das *N*-methylierte C06-Derivat **ST-1749 (450)**, in dem die Konjugation ebenfalls aufgehoben ist, scheint ein potenter indirekter 5-LO-Inhibitor zu sein – IC_{50} -Wert von $0.94 \mu M$ im zellbasierten Assay und $> 30 \mu M$ unter zellfreien Bedingungen. Zudem sind der Thiazol-2-Kohlenstoff und der Stickstoff sp^3 -hybridisiert, wodurch der Tolyrest und das freie Elektronenpaar des Stickstoffs eine andere Orientierung einnehmen, die für den Aktivitätsverlust verantwortlich sein könnte.

5.2.3.6 Arylidenvariationen

Die Variationen des Thiazolonkerns deuten daraufhin, dass die 2-Arylthiazol-Grundstruktur und auch die räumliche Anordnung der beiden Arylrest zueinander, in dieser Strukturklasse essentiell für die 5-LO-Aktivität sind. Infolgedessen wurden Derivate mit veränderter Arylidstruktur synthetisiert und auf ihr 5-LO-Inhibitionspotential untersucht (Tabelle 9).

Tabelle 9: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] von 2-Arylthiazol-Arylidenderivaten

Code (Substanz nr.)		IC_{50} [μM] (95% Konfidenz- intervall, $n \geq 3$)	
		S100	PMNL
ST-1635 (452)		1.97 (1.53- 2.52)	10
ST-1757 (454)		6.15 (1.55- 24.85)	8.55 (3.92- 18.67)
ST-1756 (457)		0.35 (0.26- 0.46)	0.22 (0.17- 0.28)
ST-1758 (461)		0.12 (0.11- 0.14)	0.41 (0.32- 0.51)

ST-1688 (464)		0.35 (0.28- 0.44)	0.79 (0.63- 0.98)
ST-1827 (471)		0.59 (0.46- 0.87)	1.56 (1.25- 1.95)

Die Einführung einer Methylgruppe (ST-1635 (452)) bzw. einer raumerfüllenden *para*-Methoxyphenylgruppe (ST-1757 (454)) an der Benzylideneinheit beeinträchtigt in hohem Maße die Bindung an die 5-LO (IC₅₀-Werte S100: 1.97 μ M und 6.15 μ M; PMNL: 1.04 μ M und 8.55 μ M). Diese Ergebnisse und die hohe chemische Stabilität von C06 gegenüber Nukleophilen, wie Reduktionsmitteln und Methyllithium (auch in Gegenwart von Lewissäuren), widerlegen die vorherige Hypothese^[249], dass die Doppelbindung als Michaelakzeptor fungiert und dies für die 5-LO-Affinität notwendig sei.

In ST-1756 (457) ist der 5-Arylrest durch eine zusätzliche Doppelbindung vom Thiazolonring verschoben, was in niedrigen IC₅₀-Werten in beiden Assaysystemen resultiert (0.35 und 0.22 μ M). Das Adamantylderivat ST-1758 (461) mit seiner niedrigen micromolaren Aktivität (IC₅₀-Wert (S100) = 0.12 μ M, (PMNL) = 0.41 μ M) zeigt, dass dieser Substituent nicht aromatisch sein muss. Um diese Aussage zu bekräftigen, wurde das 5'-Cyclohexylderivat ST-1688 (464) hergestellt und auf seine 5-LO-Aktivität untersucht. ST-1688 (464) existiert nur in Form des vinylogenen Enoltautomers Cyclohexylidenmethyl-4-hydroxythiazol. Diese neuartige Struktur zeigt die gleichen IC₅₀-Werten wie C06 (0.35 μ M und 0.79 μ M). Das zur besseren Vergleichbarkeit zu C06 synthetisierte, racemisch vorliegende Methoxyanalogon ST-1827 (471) zeigt ein ähnliches Verhalten unter zellfreien Bedingungen und einen etwas höheren IC₅₀-Wert im PMNL-Assay. Beide Hydroxythiazol-Derivate weisen neben ihrem guten 5-LO-Inhibitionspotential zudem eine gesteigerte Löslichkeit in DMSO und wässrigen Puffer auf (ST-1688 (464): 50 nM in DMSO, 100 μ M in Puffer; ST-1827 (471): 50 nM in DMSO, 80 μ M in Puffer).

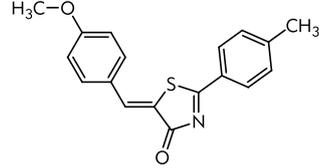
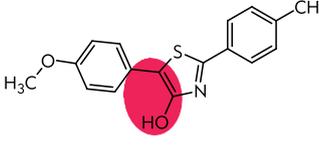
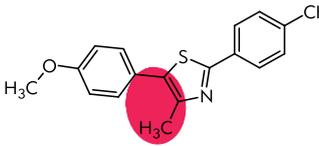
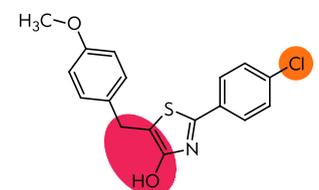
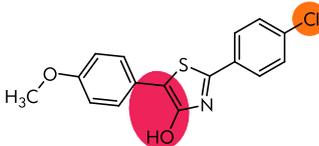
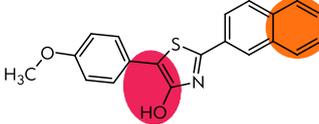
5.2.3.7 Weiterentwicklung und Optimierung der 2,5-Diaryl-4-hydroxy-thiazole

Aufgrund des großen Potentials der 4-Hydroxythiazole, ihrer verbesserten Löslichkeit und um zu untersuchen, ob die Yliden-Struktureinheit wichtig für die 5-LO-Aktivität ist, wurde das an der Doppelbindung reduzierte und daher als Hydroxythiazole vorliegende C06-Derivat ST-1741 (472) synthetisiert (Tabelle 10). ST-1741 (472) weist vielversprechende, submikromolare IC₅₀-Werte von 0.20 μ M im S100- sowie 0.72 μ M im PMNL-Assay auf und ist wie die Ylidene-methyl-4-hydroxythiazolole besser löslich.

Das Entfernen der benzylischen Methylengruppe von ST-1741 (472) führt zum C06-analogen Diarylhydroxythiazol ST-1700 (487), das die 5-LO-Produktbildung mit IC₅₀-Werten von 0.17 μ M bzw. 0.43 μ M inhibiert. Das 4-Methylthiazol ST-1747 (490) hingegen weist nur eine indirekte 5-LO-Inhibition auf (S100: > 30 μ M, PMNL: 1.50 μ M).

5.2.3.7 Weiterentwicklung und Optimierung der 2,5-Diaryl-4-hydroxy-thiazole

Tabelle 10: Inhibition der 5-LO-Produktbildung^[249] der 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-ole, der 2,5-Diarylthiazol-4-ole und zum Vergleich **C06**, experimentell bestimmt Löslichkeiten, berechnete logP_[356,357] und logS-Werte^[356].

Code (Substanz nr.)	Struktur	IC ₅₀ [μ M] (95% Konfidenz- interval, n \geq 3)		Löslichkeit		clogP _[357]	clogS _[356]
		S100	PMNL	in DMSO [mM]	in PBS (1% DMSO) [μ M]	_[356]	_[356]
C06 (182)		0.30	0.66	10	30	3.69 3.78	-5.24
ST-1741 (472)		0.20 (0.16- 0.26)	0.72 (0.57- 0.91)	100	80	5.38 5.32	-4.35
ST-1700 (487)		0.17 (0.14- 0.22)	0.43 (0.33- 0.55)	50	50	5.26 5.55	-4.64
ST-1747 (490)		> 30	1.50 (0.87- 2.59)	-	-	5.48 5.85	-5.03
ST-1829 (493)		0.03 (0.02- 0.04)	0.14 (0.11- 0.18)	100	80	5.60 5.62	-4.75
ST-1748 (494)		0.05 (0.04- 0.06)	0.01 (0.008- 0.02)	50	50	5.48 5.85	-5.03
ST-1828 (496)		0.14 (0.08- 0.23)	0.24 (0.16- 0.38)	-	-	5.94 6.42	-5.90

Die Klasse der Diarylhydroxythiazole wurde bereits in den 1990iger Jahren von Abbott als 5-LO-Inhibitoren beschrieben^[418] und patentiert^[432,433]. Durch eine eingehende Untersuchung des 2,5-Diaryl-4-hydroxythiazol-Strukturmotiv wurde gezeigt, dass die Arylsubstituenten ebenso wie die Hydroxygruppe wichtig für die 5-LO-Aktivität sind. Nur acetylierte 4-Hydroxythiazole zeigten ebenfalls 5-LO-Aktivität. Zudem gleicht die Struktur-Aktivität-Beziehung der 2,5-Diaryl-4-hydroxythiazole der der Aryliden-aryl-thiazolone: polare Substituenten verringern die Aktivität, kein direkter Zusammenhang zwischen Aktivität und der Natur der Substituenten (elektronischen Eigenschaften und Fähigkeiten Wasserstoffbrücken-Bindungen auszubilden) erkennbar.^[418]

Mit **ST-1741 (472)** und **ST-1700 (487)** als neue Leitstrukturen wurden die Klassen der 2,5-Diarylthiazol-4-ole und 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-ole als 5-LO-Inhibitoren weiteruntersucht. In den vorangegangenen SAR-Studien^[225,249] zeigte sich, dass durch den Substituentenwechsel von Methyl zu Chlor und Naphthyl am 3'-Arylrest eine deutliche Aktivitätssteigerung erzielt werden konnte. Dementsprechend wurden die chlor- und naphthylsubstituierten Diaryl-(Methyl)-thiazol-4-ole synthetisiert und ihr 5-LO-Inhibitionspotential bestimmt (Tabelle 10).

Der Austausch des Methylsubstituenten in **ST-1741 (472)** durch Chlor (**ST-1829 (493)**) führt zu einer über sechsfachen Steigerung der Inhibition der 5-LO-Produktbildung in beiden Assay-systemen (S100: 30 nm verglichen mit 200 nM und PMNL: 140 nm verglichen mit 720 nM). Mit den beiden 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-ole wurde zudem ein limitierender Faktor der *In vivo*-Untersuchungen an **C06** eliminiert. Sowohl **ST-1741 (472)** als auch **ST-1829 (493)** weisen eine zehnfach höhere Löslichkeit in DMSO und eine mehr als doppelt so hohe Löslichkeit in wässrigem Puffer auf, obwohl die berechnete Lipophilie (clogP) höher und der clogS-Wert geringer ist.

Im Falle des Chlor-2,5-Diarylthiazol-4-ols **ST-1748 (494)** ist die Aktivitätssteigerung im Bezug auf das Methylderivat unter zellfreien Bedingungen vergleichbar mit denen der Arylmethylthiazol-4-ole (von 170 nM für **ST-1700 (487)** und 50 nM für **ST-1748 (494)**). Im PMNL-Assay dagegen inhibiert das Chlorderivat **ST-1748 (494)** die 5-LO-Produktbildung mit einem über 40-fach niedrigerem IC₅₀-Wert als der von **ST-1700 (487)** (10 nM verglichen mit 430 nM), wobei die Löslichkeit der Diarylthiazolole in DMSO und Puffer nur marginal höher ist als die von **C06**. Die beobachtete Potenzsteigerung beim Übergang von Chlorphenyl zu Naphthyl zeigte sich bei den 2,5-Diarylthiazol-4-ole nicht. **ST-1828 (496)** weist höhere IC₅₀-Werte von 140 nM im S100 und 240 nM im PMNL-Assay auf.

2-(4-Chlorphenyl)-5-(4-methoxybenzyl)thiazol-4-ol (**ST-1829 (493)**) ist die vielversprechendere Leitstruktur, da sie eine deutlich höhere Löslichkeit als die 2,5-Diarylthiazol-4-ole aufweist, obwohl die hier synthetisierten Diarylthiazolole **ST-1700 (487)**, **ST-1748 (494)** und **ST-1828 (496)** ein höheres Inhibitionspotential für die 5-LO-Produktbildung aufweisen, als die affinsten von Abbott beschriebenen Substanzen.^[418] Die Entwicklung dieser Strukturklasse wurde von Abbott nicht weiter verfolgt, allerdings sind sie durch die generische Struktur patentrechtlich geschützt.^[432,433]

Die Ergebnisse wurden von A. Lill und C. Rödl *et al.* publiziert.

6.2.4 5-LO-Inhibitionspotential in Gegenwart von fetalem Kälberserum

Um beurteilen zu können, wie sich die optimierten Verbindungen **ST-1829 (493)** und **ST-1748 (494)** unter physiologischen Bedingungen bzw. in Gegenwart von Blutplasma verhalten, wurden sie, und zum **C06** zum Vergleich, mit fetalem Kälberserum (FCS) inkubiert und das Inhibitionspotential wurde bestimmt (Abbildung 58). Dieser Versuch dient als Vorversuch zum Vollblut-Assay, der Hinweise auf das Verhalten in *In vivo*-Test geben kann.

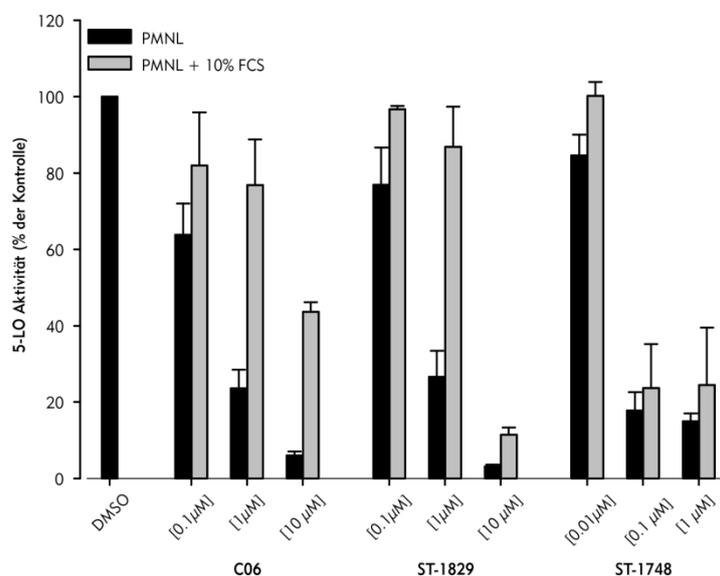
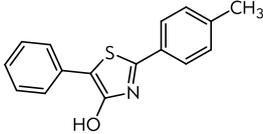
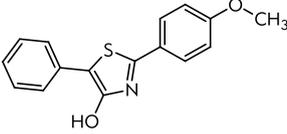
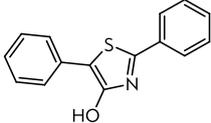


Abbildung 58: 5-LO Restaktivität in PMNL bei Inkubation mit **C06**, **ST-1829 (493)** und **ST-1748 (494)** mit und ohne 10% fetalem Kälberserum (FCS).

C06 zeigt bei einer Konzentration von 10 μM ein über siebenfach niedrigeres Inhibitionspotential bei Anwesenheit von fetalem Kälberserum (FCS) im Vergleich zu einer normalen Bestimmung in PMNLs (6% Restaktivität verglichen mit 44%). Dieser enorme Aktivitätsverlust ermöglicht aufgrund der hohen Plasmabindung und wegen der niedrigen Löslichkeit keine weiteren *In vivo*-Untersuchungen (vgl. auch^[225]). Verbindung **ST-1829 (493)** weist in Gegenwart von 10% FCS, bei einer Konzentration von 1 μM , eine reduzierte inhibitorische Aktivität auf. Dieser Effekt ist aber bei einer Konzentration von 10 μM nicht zu beobachten, so dass die Aktivität durch den FCS Zusatz nur um das Vierfache sinkt und die 5-LO-Restaktivität bei nur 11% liegt (3% ohne FCS Zusatz). Im Falle von **ST-1748 (494)** wird die 5-LO-Restaktivität in Gegenwart von 10% FCS, bei einer Inhibitorkonzentration von 0.1 μM bzw. 1 μM , nur geringfügig beeinflusst (mit FCS: 25%, ohne FCS: 20%).

Die 2,5-Diaryl-4-hydroxythiazole werden von Abbott als potente, selektive 5-LO-Inhibitoren beschrieben, die im Allgemeinen im Vollblutassay um Einiges weniger potent sind, wobei das Tolylderivat **497** den gleichen IC_{50} -Wert wie in Ratten-Leukozyten (RBL-1 entspricht S100) aufweist (Tabelle 11). Das Phenyl-Methoxyderivat **498** hingegen zeigt im Vollblutassay ein verringertes 5-LO-Inhibitionspotential mit einem IC_{50} -Wert von 2.4 μM während dieser im RBL-1 0.37 μM bzw. im Rattenzellen-basierten Assay (RPMNL) 0.45 μM beträgt. Die höheren IC_{50} -Werte werden dabei der Plasmaproteinbindung zugeschrieben. Für das 3,5-Diphenylthiazol-4ol (**499**) ist nur der RBL-1 IC_{50} -Wert mit 0.53 μM angegeben.

Tabelle 11: Inhibition der 5-LO-Produktbildung einiger Abbott 2,5-Diaryl-4-hydroxythiazole **497-499**^[418]

Substanz nr.	Struktur	IC ₅₀ [μ M]		
		RBL-1	RPMNL	HWBL
497		0.8	-	0.74
498		0.37	0.45	2.4
499		0.53	-	-

RBL = 20,000 x g Überstand von Rattenblut-Leukozyten; RPMNL = Ratten Polymorphonukleare Leukozyten; HWBL = humanes Vollblut; n.a. = nicht angegeben.

Die durch Inkubation mit 10% FCS nachgewiesene 5-LO-Inhibition von **ST-1748 (494)** lässt vermuten, dass dieses Diarylhydroxythiazol eines der wenigen im Vollblutassay aktiven Derivate ist. Die IC₅₀-Werte von **ST-1748 (494)** liegen mit 0.05 μ M im S100- und 0.01 μ M im PMNL-Assay mehr als eine Zehnerpotenz unter denen von **498**, dem potentesten von Abbott veröffentlichten Diarylhydroxythiazol.

Trotz der vielversprechenden Vollblutdaten einiger Derivate sind Abbotts *In vivo*-Studien an einer zu geringer Absorption und der geringen Löslichkeit der Diarylhydroxythiazole gescheitert, obwohl **499** in *In vivo*-Versuchen signifikante Ergebnisse bei der oralen Gabe lieferte. Die Diarylhydroxythiazole werden von Abbott nur zur Verwendung als potentielle, topische Therapeutika beschrieben und wurden bisher nicht weiter verfolgt.^[418]

Die 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-ole bzw. **ST-1829 (493)** weisen verglichen mit den 3,5-Diaryl-4-hydroxythiazolen und mit **C06** eine hohe Löslichkeit in DMSO und in wässrigen Puffer auf. Die Löslichkeit ist, wie **C06** und Abbotts Diarylhydroxythiazole gezeigt haben, unabdingbar für *In vivo*-Experimente, wohingegen der Aktivitätsverlust in Gegenwart von FCS bzw. im Vollblut-Assay nicht zwangsweise das Scheitern in *In vivo*-Versuche bedeutet.^[434]

6.2.5 Toxizitätsmessungen ausgewählter synthetisierter Substanzen

Von den (optimierten) 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-olen, 2,5-Diarylthiazol-4-olen, **C06** und von ausgewählten Substanzen aus jeder Inhibitorgruppe wurde jeweils die Toxizität im WST-1-Assay und der Lactatdehydrogenase (LDH) Ausfluss bestimmt.

Tabelle 12: Toxizitätsbestimmung im WST-1- und LDH-Assay (Linien = andere Inhibitorgruppe)

Code (Substanznr.)	WST-1- Assay IC ₅₀ [μM]	LDH-Ausfluss bei 30 μM [%]	Code (Substanznr.)	WST-1- Assay IC ₅₀ [μM]	LDH-Ausfluss bei 30 μM [%]
C06 (182)	> 30	2.7 ± 2.8	ST-1501 (409)	> 30	7.8 ± 1.6
ST-1741 (472)	> 30	n.d.	ST-1636 (410)	> 30	4.4 ± 1.0
ST-1829 (493)	> 30	4.1 ± 3.4	ST-1745 (414)	> 30	2.5 ± 1.0
ST-1700 (487)	> 30	3.0 ± 2.1	ST-1746 (415)	> 30	7.8 ± 3.2
ST-1748 (494)	> 30	n.d.	ST-1750 (424)	> 30	3.2 ± 2.2
ST-1828 (496)	> 30	2.2 ± 0.7	ST-1693 (432)	> 30	n.d.
ST-1498 (349)	30	40.3 ± 6.3	ST-1749 (450)	> 30	n.d.
ST-1499 (361)	17	60.5 ± 11.1	ST-1635 (452)	12	106.0 ± 11.1
ST-1629 (377)	18	95.6 ± 8.9	ST-1757 (454)	16	5.9 ± 1.4
ST-1630 (381)	30	33.3 ± 3.1	ST-1756 (457)	> 30	n.d.
ST-1740 (378)	> 30	n.d.	ST-1758 (461)	2	31.5 ± 3.3
ST-1631 (389)	<3	108.4 ± 7.9	ST-1688 (464)	21	23.3 ± 1.8
ST-1500 (388)	<3	93.1 ± 2.3	ST-1827 (471)	> 30	1.5 ± 2.0

n.d. = kein LDH-Ausfluss detektierbar

Wie auch **C06** zeigen sowohl die 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-ole **ST-1741 (472)** und **ST-1829 (493)** als auch die 2,5-Diarylthiazol-4-ole **ST-1700 (487)** und **ST-1748 (494)** keinerlei Zelltoxizität oder antiproliferative Effekte. Sie beeinflussen weder die Zellvitabilität (WST-1) noch die Integrität der Zellmembran (LDH-Ausfluss).

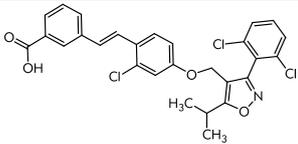
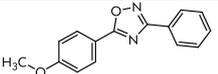
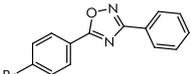
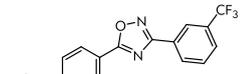
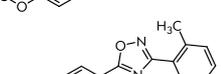
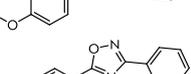
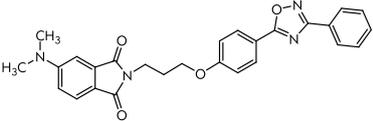
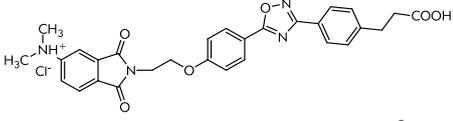
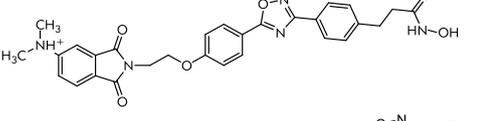
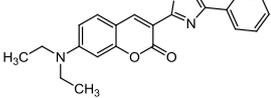
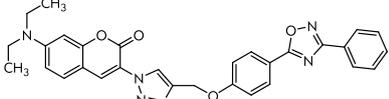
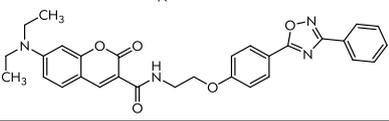
Das Anilin **ST-1498 (349)** weist eine gewisse, für Aniline typische, Zelltoxizität im LDH-Assay auf. **ST-1631 (389)** und **ST-1500 (388)** weisen aufgrund ihrer zum kovalenten Labeling fähigen, reaktiven Gruppen eine inhärente Toxizität auf. Die meisten anderen getesteten Verbindungen zeigen außer dem an der Benzylideneinheit methylierten Derivat **ST-1635 (452)** und dem Adamantylderivat **ST-1758 (461)** keinerlei Toxizität in beiden Assaysystemen. **ST-1758 (461)** scheint schon in niedrigen Konzentrationen (IC₅₀-Wert 2 μM) erheblich in die mitochondriale Atmungskette einzugreifen.

6.3 Aktivitäten ausgewählter Liganden am Farnesoid X Rezeptor (FXR)

Die in Tabelle 13 gezeigten Verbindungen wurden von Herrn Matthias Gabler (AK Prof. Schubert-Zsilavec) auf ihr Bindungsverhalten am nukleären Farnesoid Rezeptor X (FXR) in HeLa-Zellen^[435] untersucht.

Der FXR bindet Gallensäuren, wandert zum Zellkern und bindet an Hormon-response-Elemente der DNS, was die Regulation bestimmter Gene beeinflusst, z.B. Gene, die die Fettsäuresynthese^[436] steuern. Einer der Hauptfunktionen von FXR ist die Unterdrückung der Gallensäureproduktion.^[437] Zudem bewirkt eine Aktivierung von FXR eine vermehrte Insulinfreisetzung, weshalb FXR-Agonisten potenziell antidiabetische Effekte aufweisen könnten.^[438,439]

Tabelle 13: Untersuchung der Aktivität ausgewählter Liganden an FXR (Linien = andere Inhibitorgruppe)

Code	Struktur	Agonistische Aktivität (EC ₅₀ [μM])	Antagonistische Aktivität (IC ₅₀ [μM])	Beobachtete Toxizität (bei 30 μM)
GW 4064		0,51 ± 0,16	-	nein
ST-1422		<i>inaktiv*</i>	aktiv ab 20 μM (73.2 % ± 9.3 %)**	nein
ST-1423		0.35 ± 0.06	-	nein
ST-1420		2.89 ± 0.41	-	nein
ST-1421		0.12 ± 0.01	-	nein
ST 1425		<i>inaktiv*</i>	<i>n.d., da toxisch</i>	ja
ST-1352		<i>inaktiv*</i>	<i>inaktiv*</i>	nein
ST-1436		<i>inaktiv*</i>	<i>inaktiv*</i>	ja
ST-1455		<i>inaktiv*</i>	-	nein
ST-1353		0.46 ± 0.03	-	nein
ST-1354		1.55 ± 0,13	-	nein
ST-1349		<i>inaktiv*</i>	<i>inaktiv*</i>	nein

6.3 Aktivitäten ausgewählter Liganden am Farnesoid X Rezeptor (FXR)

C06		5.39 ± 0.46	-	nein
ST-1741		1.79 ± 0.31	-	nein
ST-1700		<i>inaktiv*</i>	<i>inaktiv*</i>	nein
ST-1498		-	2.88 ± 0.36	nein
ST-1742		-	aktiv ab 10 µM (22.0 % ± 1.4 %)**	nein
ST-1689		<i>inaktiv*</i>	<i>inaktiv*</i>	nein
ST-1698		<i>inaktiv*</i>	<i>inaktiv*</i>	nein

*keine Aktivität messbar bei 10 µM; ** Restaktivität bei 30 µM + 3 µM GW4064 (Agonist); *** Restaktivität bei 3 µM + 3 µM GW4064 (Agonist); - nicht bestimmt

Alle getesteten Diaryl-1,2,4-oxadiazole (**ST-1420** - **ST-1423**) waren an FXR aktiv, wobei **ST-1425** aufgrund der phenolischen Toxizität nicht näher charakterisiert werden konnte. Das methoxysubstituierte Oxadiazol **ST-1422** zeigt überraschender Weise eine antagonistische Wirkung am FX Rezeptor, wohingegen das Bromderivat **ST-1423** eine agonistische zeigt. Die am 3-Phenylrest substituierten Diaryl-1,2,4-oxadiazole **ST-1420** und **ST-1421** sind ebenfalls agonistisch aktiv, wobei **ST-1421** einen EC₅₀-Wert von 120 nM aufweist. Das mit 4-DMAP-gelabelte Oxadiazol **ST-1352** ist weder agonistisch noch antagonistisch aktiv, ebenso die beiden Propan säurederivate **ST-1436** und **ST-1455**. Von den drei getesteten Diethylaminocoumarin-Diphenyl-Oxadiazolen **ST-1353**, **ST-1354** und **ST-1349** sind nur **ST-1353** und **ST-1354** agonistisch aktiv, obwohl sich **ST-1354** und **ST-1349** nur in ihrer Verknüpfung zwischen Coumarin und Diphenyl-Oxadiazole unterscheiden.

Die ebenfalls getesteten 5-LO-Inhibitoren weisen auch den, durch geringfügige Veränderungen hervorgerufen Wechsel von Agonismus zu Antagonismus auf – **C06** wirkt agonistisch wohingegen das Anilinderivat **ST-1498** antagonistisch aktiv ist. Das strukturell verwandte Hydroxythiazol **ST-1741** ist wie **C06** ein Agonist, wohingegen das Diarylhydroxythiazol **ST-1700** keine Aktivität zeigt. Das Sulfonamid **ST-1742** ist ein hochpotenter FXR-Antagonist, während das Zimtsäurederivat **ST-1689** und das Dichlorphenylderivat **ST-1698** nicht an FXR aktiv sind.

Ein Manuskript mit den Ergebnisse von Gabler, Merck, Flesch und Lill *et al.* ist in Bearbeitung.

6. Labelingexperimente

6.1 Kovalentes Labeling (wash-Out Versuch)

Um zu testen, ob das Bromketon **ST-1631 (389)** und die Arylsäure **ST-1500 (388)** kovalent an die 5-LO binden, wurde ein wash-out Versuch mit PMNL-Zellen und mit aufgereinigter 5-LO durchgeführt.^[440]

Beide Inhibitoren konnten im PMNL und im zellfreien wash-out Versuch ausgewaschen werden, da keine signifikante Inhibition der 5-LO-Produktbildung festgestellt werden konnte. Es kann daher davon ausgegangen werden kann, dass **ST-1631 (389)** und **ST-1500 (388)** keine kovalente Bindung zur 5-LO ausbilden. Dies kann unter anderem damit erklärt werden, dass sich in der modellierten, allosterischen Bindetasche der Aryliden-Aryl-Thiazolone kein Cystein befindet^[248].

6.2 Photoaffinity-Labeling

In der Literatur werden verschiedene Wellenlängen zur Bestrahlung bzw. zur Photoaktivierung der Arylazide und Benzophenone angegeben. Für die Arylazide liegen diese zwischen 254 nm und 350 nm (meist 254 nm), wobei die Bestrahlungszeit sehr unterschiedlich ist (5 min bis 48 Stunden).^[177,186,441-443] Die verwendeten Lichtquellen reichen von Lasern, über UV-Kabinett bis hin zu Sonnenlicht, wobei vielen Publikationen keine genauen Angaben machen oder diese unzureichend sind. Bei den Benzophenonen sind die Angaben ähnlich unpräzise (300 nm – 365 nm, 15 min bis 2 Stunden), wobei meist eine Wellenlänge von 360 nm angegeben wird.^[177,186,187,444,445]

Aufgrund dieser schwankenden Angaben wurde von dem Azidderivat und den Benzophenonen jeweils ein Absorptionsspektrum in DMSO aufgenommen. Die aufgenommenen Absorptionsspektren zeigen, dass das Azid **ST-1692 (391)** kein Absorptionsmaximum bei 254 nm besitzt - vielmehr liegt das Maximum bei 416 nm. Die Benzophenone **ST-1694 (394)**, **ST-1701 (398)** und **ST-1695 (401)** weisen bei der üblicherweise angegebenen Bestrahlungswellenlänge von 360 nm sogar ein Absorptionsminimum auf. Ihre Maxima liegen bei 401 nm, 410 nm und bei 425 nm (vgl. 8.3.3 Absorptionsspektren der 5-LO-Inhibitoren zum kovalenten Labeling).

6.2.1 EPR-Messungen von ST-1694

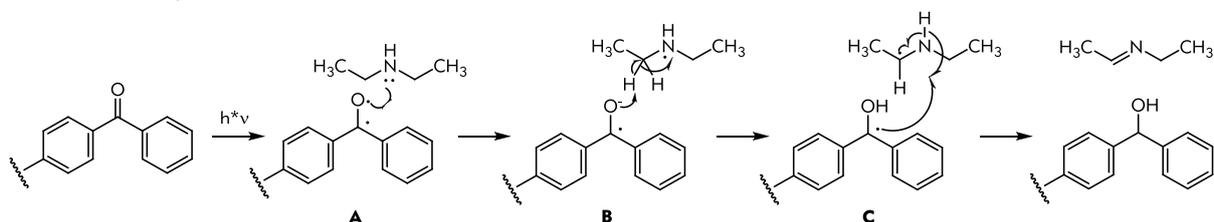
Um die Bildung eines Radikals bei Bestrahlung des Benzophenons **ST-1694 (394)** nachzuweisen, wurde im Arbeitskreis von Prof. Priser mit Unterstützung von Dr. Krstic, Elektronen-Spin-Resonanz Experimente (ESR) durchgeführt. Dazu wurde eine 5 nM Lösung von **ST-1694 (394)** in wasserfreiem, vielfach entgastem Toluol im cw-ESR-Spektrometer (cw = continuous wave) mit einer Quecksilber-Xenon-Lampe bestrahlt. Dabei wurde die Filterkombination so gewählt, dass sie für Licht mit einer Wellenlänge von ca. 400 nm durchlässig ist. Das Lösungsmittel muss dabei frei von Sauerstoff sein, da dieser das entstehenden Radikal sehr effektiv quencht^[446] wie es auch bei der Trocknung von Lösungsmittel durch Destillation über Natrium und Benzophenon geschieht.

Die durchgeführten Experimente konnten die Existenz eines Radikals nach Bestrahlung nicht bestätigen, da das entstehende Radikal eine zu kurze Halbwertszeit (ca. 300 ns bei Raumtem-

peratur) besitzt und mit einem cw-ESR-Spektrometer nicht detektiert werden kann. Das Tripletttrradikal kann mangels Reaktionspartner auch nicht durch H-Abstraktion in das langlebigere Singuletttrradikal übergehen, das hätte detektiert werden können. Durch eine zeitaufgelöste Messung bei tiefen Temperaturen an einem gepulsten ESR-Spektrometer wäre der Nachweis des Tripletttrradikals möglich gewesen.^[447] Dies stand jedoch nicht zur Verfügung und hätte einen erheblich Aufwand seitens Herrn Krstic bedeutet, da ESR-Messungen keine automatisierten Servicemessungen sind.

6.2.2 Bestrahlungsexperimente

Da der Nachweis des durch Bestrahlung entstehenden Radikals nicht ohne Weiteres möglich gewesen war, wurde ein Nachweis des Reaktionsaddukt aus dem Benzophenontripplettrradikal **A** und Diethylamin gewählt. Nach Cohen und Baumgarten^[448] reagieren Benzophenone in Kohlenwasserstoffen unter Bestrahlung und in Gegenwart von sekundären Aminen zu Benzpinacol und dem entsprechenden Imin (Schema 71).



Schema 71: Photoreaktion zwischen einem Benzophenon und Diethylamin zum entsprechenden Benzpinacol und *N*-ethylideneethanamin.^[448-450]

Als Vorversuch wurde Benzophenon in wasserfreiem, entgastem Toluol mit einem Äquivalent Diethylamin für 5 Minuten in einem Multi-LED-Gerät (Eigenbau AK Heckel, LEDs von Roithner Lasertechnik) bei 365 nm (250 mW) bestrahlt. Dabei wurde das Reduktionsprodukt Benzhydrol^[451] isoliert. Es konnte somit gezeigt werden, dass mit der verwendeten Lichtquelle eine Photoaktivierung von Benzophenon möglich ist.

Die Bestrahlung der Benzophenone **ST-1694 (394)**, **ST-1701 (398)** und **ST-1695 (401)** erfolgte jeweils in ca. 5 mM Lösung in wasserfreiem, entgastem Toluol mit einem Äquivalent Diethylamin. Die Proben wurden ebenfalls in dem Multi-LED-Gerät bei 405 nm (105 mW) bzw. 420 nm (130 mW), je nach Absorptionsmaximum, für 30 Minuten bestrahlt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und im Hochvakuum getrocknet. In allen Fällen war im ¹H-NMR-Spektrum ein Reaktionsaddukt aus dem jeweiligen Benzophenon und Diethylamin zu erkennen. Die Umsetzung lag dabei zwischen 5% und 50%. Im Falle von **ST-1701 (398)** konnte zusätzlich das reduzierte Benzophenon (Benzhydrol) nachgewiesen werden (¹H-NMR- und Massenspektroskopie). Eine Licht unabhängige Reaktion wurde durch die entsprechenden Versuche ohne Bestrahlung ausgeschlossen.

Das Azid wurde nach Goeldner *et al.*^[175] ebenfalls in Gegenwart von Diethylamin für 30 Minuten bestrahlt. Auch hier konnte im ¹H-NMR-Spektrum eine deutliche Veränderung festgestellt werden, welche ohne Bestrahlung nicht zu beobachten war.

Durch die Bestrahlungsversuche konnte gezeigt werden, dass sowohl das synthetisierte Azido-Aryliden-Aryl-Thiazolon als auch die Benzophenonderivate eine durch Licht induzierte Reaktion mit sekundären Aminen eingehen und sich daher zum Photoaffinity-Labeling eignen.

6.2.3 Photoaffinity-Labeling und wash-Out Versuch

ST-1694 (394), ST-1701 (398) und ST-1695 (401) ($1 \mu\text{M}$) wurde jeweils für 15 Minuten bei 37°C mit frisch isolierten PMNL-Zellen inkubiert und anschließend bei 405 nm (105 mW) bzw. 420 nm (130 mW), je nach Absorptionsmaximum, für 30 Minuten in einem Multi-LED-Gerät (Eigenbau AK Heckel, LEDs von Roithner Lasertechnik) bestrahlt. Der verwendete Puffer wurde zuvor mehrfach entgast. Die wash-out-Versuche wurden wie unter 8.4.5 Bestimmung der 5-LO-Produktbildung mit Wash-Out beschrieben durchgeführt.

Es konnte keine signifikante Inhibition der 5-LO durch die Substanzen in den wash-out Versuchen festgestellt werden. Alle Inhibitoren ließen sich nach Bestrahlung wieder auswaschen und sind folglich keine kovalente Bindung eingegangen. Dass die Benzophenone keine kovalente Bindung zur 5-LO ausgebildet haben, kann damit begründet werden, dass die Benzophenoneinheit in ihrer unmittelbaren Umgebung (Radius von 3.1 \AA um die Carbonylgruppe)^[186] nicht im direkten Kontakt mit der 5-LO steht. Die modellierte, allosterische Bindungstasche^[248] als auch die kontinuierliche SAR an den beiden Arylsubstituenten^[225,249] unterstützen diese Vermutung. Zudem geht eine allosterische Bindung mit einem hohen Maß an konformationeller Freiheit einher, die der Ausbildung einer kovalenten Bindung entgegen wirkt.

7. Zusammenfassung

Sphingolipide sind an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Körper beteiligt. Vor Allem das sowohl auto- als auch paracrinwirkende Sphingosin-1-Phosphat (S1P) spielt dabei eine essentielle Rolle. Ein Großteil der S1P-vermittelten / regulatorischen Effekte beruht auf dessen Wechselwirkung mit den fünf G Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren (S1P₁₋₅). S1P nimmt hierüber Einfluss auf das Schicksal der Zellen (Proliferation, Überleben, Migration), die Zellmobilität, die Angiogenese und das Immunsystem. Viele der über die S1P-Rezeptor-vermittelten Effekte sowie deren Rolle und Funktion in einzelnen Geweben oder Organen sind bis heute noch nicht komplett verstanden bzw. erklärbar. Pharmakologische Tools können einen wichtigen Beitrag zur weiteren Erforschung und zum Verständnis des komplexen Sphingolipidnetzwerks leisten.

Ausgehend von einer substituierten Diaryl-1,2,4-oxadiazol-Leitstruktur, die in der Literatur als privilegierte Struktur für S1P₁-Rezeptoragonisten gilt, und dem selektiven S1P₁-Agonisten SEW2871 wurden verschiedene Liganden mit unterschiedlichen chemischen Gruppen synthetisiert (vgl. R₂ in Abbildung 59). Nach der Etablierung eines Synthesewegs zu etherverknüpften Aminoethan-diphenyl-1,2,4-oxadiazolen wurden diese in die fluoreszierenden Dansyl-, Isoindolin-, Pyridinium-Dye- und Coumarin-gelabelten Derivate überführt. Außerdem wurde eine einfache und optimierte Syntheseroute zu dem kleinen, umgebungsempfindlichen Fluorophor 4-(Dimethylamino)phthalimid (4-DMAP) entwickelt, dass entlang eines linearen Synthesewegs in guten Ausbeuten auch mit den Trifluormethyl- und Methyl-substituierten Diphenyloxadiazol-Grundstrukturen (R¹) zu fluoreszenzmarkierten Derivaten umgesetzt wurde. Um den Einfluss des Fluorophores auf die Bindung an den S1P₁-Rezeptor minimal zu gestalten, wurden außer kleinen Fluorophoren auch kurze Linker verwendet, damit die fluoreszenzmarkierten Derivaten in ihrer Gesamtheit als Ligand fungieren können. Das Fluorophor und der Linker sollen dabei die lange Kohlenstoffkette des natürlichen Substrates S1P (C15-Kette) imitieren und auch in der Bindetasche Platz finden. Zur weiteren Minimierung der Molekülgröße wurde ein Arylrest der Leitstruktur durch Coumarin ersetzt. Weiterhin wurde durch Kupfer(I)-katalysierte Click-Chemie ein triazol-verknüpftes Coumarindiphenyloxadiazol synthetisiert. Diese Reaktion zum Aufbau des Triazols aus einem Coumarinazid und einem Alkindiphenyloxadiazol könnte auch zum *In-vivo*-Labeling genutzt werden. Neben den fluoreszenzmarkierten Liganden für den S1P₁-Rezeptor wurden zudem drei substituierte Phenyloxadiazolaniline zu den entsprechenden Acrylamiden umgesetzt. Diese cysteinreaktiven Derivaten könnten durch kovalentes Labeling zur Erforschung der damals nur durch Modeling und Mutationsexperimente bekannten Bindetasche beitragen (die Kristallstruktur wurde erst 2012 gelöst):

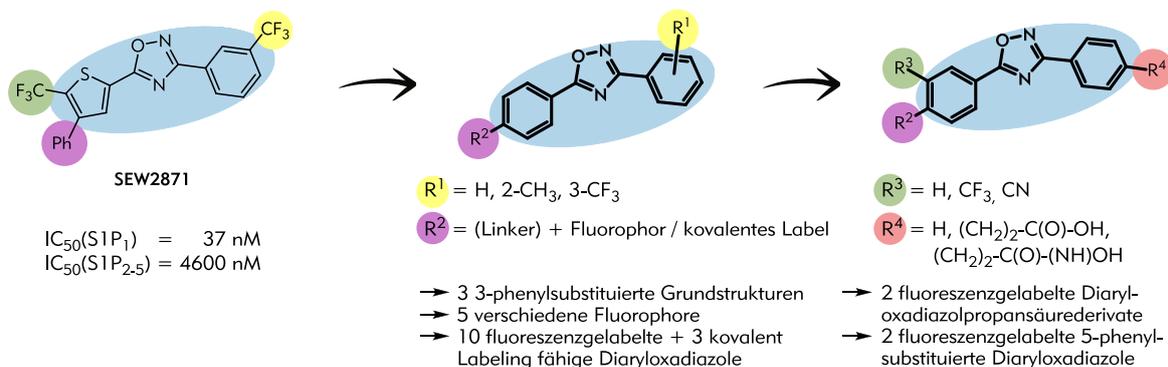


Abbildung 59: Synthetische Entwicklungen im Sphingolipidbereich.

Die ersten Affinitätstestungen der synthetisierten fluoreszenzmarkierten Liganden und einiger Diphenyloxadiazol-Grundstrukturen zeigten, dass sie nur schwache Effekte am $S1P_1$ - und $S1P_2$ -Rezeptor auslösen. Die Affinität wurde durch Messung der Dynamischer Massen-Umverteilung in einem label-free Assay bestimmt (Prof. Scholich, Institut für Klinische Pharmakologie, Goethe-Universität). Da diese Ergebnisse nicht weiter verifiziert bzw. die Liganden nicht näher auf ihr Bindungsverhalten untersucht wurden, musste davon ausgegangen werden, dass die gewählte Leitstruktur keine ausreichende Affinität zum $S1P_1$ -Rezeptor aufweist. Aus diesem Grund wurde sie durch Einführung der an $S1P_1$ -selektiven Diphenyloxadiazolen häufig verwendeten Substituenten R^3 bzw. R^4 (Abbildung 59) verfeinert.

Die Synthese der 5-(3-Trifluormethyl)- und 5-(3-Cyan-phenyl)oxadiazol-3-phenole erforderte eine Optimierung der zuvor entwickelten Synthesestrategie, da sich die elektronenärmeren Derivate in einigen Schritten als zu reaktionsträge erwiesen. Beide Phenole wurden erfolgreich zu den 4-DMAP-markierten, an der Position 3 des 5-Phenylrings substituierten Diaryloxadiazolen umgesetzt. Der Aufbau der Arylpropansäuren erfolgte durch eine Heck-Reaktion mit Acrolein-diethylacetal. Durch den Wechsel der Synthesestrategie von 1. Heck-Reaktion und 2. Oxadiazolringschluss zur umgekehrten Vorgehensweise konnten eine Reihe von synthetischen Problemen umgangen werden und die Gesamtausbeute der Synthese der 4-DMAP-gelabelten Diaryloxadiazole mit polarer Kopfgruppe (Propansäure) von unter 10% auf 48% über sechs Schritte gesteigert werden.

Die vier fluoreszenzmarkierten $S1P_1$ -Liganden mit verfeinerter Grundstruktur wurden auf ihr Vermögen GFP-markierte $S1P_1$ -Rezeptoren (GFP = Grün-Fluoreszierendem-Protein) zu internalisieren getestet (Prof. Meyer zu Heringdorf, Institut für Klinische Pharmakologie, Goethe-Universität). Dabei führt die Bindung eines Agonisten an den $S1P_1$ -Rezeptor zu einer Internalisierung des Rezeptors, die durch die GFP-Markierung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Das 5-(3-Cyan-phenyl)-substituierte, fluoreszenzmarkierte Diaryloxadiazol **ST-1627** (Abbildung 60) verursacht bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ eine leichte Internalisierung des $S1P_1$ -Rezeptors auf HEK-293-Zellen, wohingegen bei der Propansäure **ST-1436** eine deutliche Internalisierung zu beobachten ist. Die durch **ST-1436** und **ST-1627** verursachte Internalisierung lieferte weitere Hinweise, dass beide Substanzen eine durch Bindung am $S1P_1$ -Rezeptor verursachte, agonistische Wirkung haben und dass durch die Verfeinerung der Leitstruktur fluoreszenzmarkierte $S1P_1$ -Liganden synthetisiert wurden.

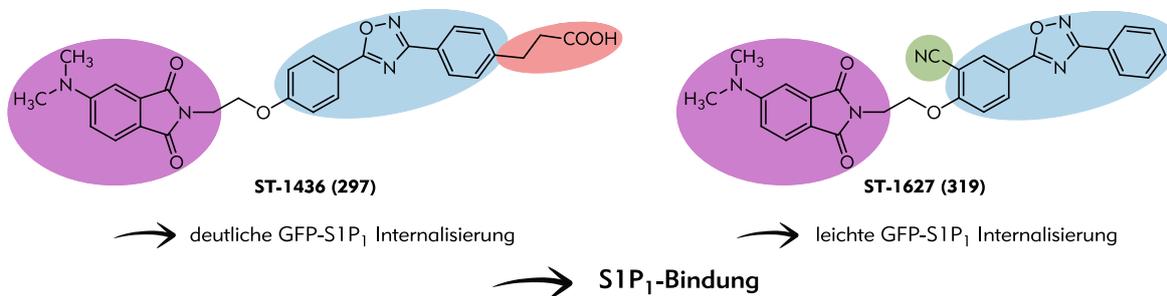


Abbildung 60: Fluoreszenzmarkierte, Diphenyloxadiazol-basierte $S1P_1$ -Liganden

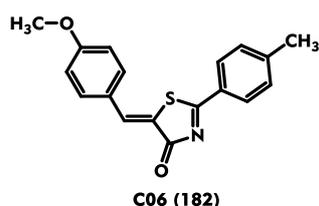
Die weitere pharmakologische Charakterisierung aller synthetisierten, funktionellen Liganden im Bereich der Sphingolipide steht noch aus.

Einige der synthetisierte Oxadiazolvorstufen und die ersten fluoreszenzmarkierten Liganden wurden auf ihr Verhalten am Farnesoid X Rezeptor (FXR) untersucht. Dabei zeigten vor allem die substituierten Diphenyloxadiazole interessante Aktivitäten. Während die Trifluormethyl- und Methyl-substituierten 4-Methoxyphenyl-phenyl-oxadiazole (**ST-1420** und **ST-1421**) und das 4-Bromderivat **ST-1423** agonistische Wirkungen zeigten, wies das 4-Methoxyderivat **ST-1422** eine antagonistische Wirkung auf. Die weitere pharmakologische Bearbeitung dieser Thematik ist in Vorbereitung und die Veröffentlichung der Ergebnisse stehen noch aus.

Da die Interaktionen und Crossreaktivitäten im Bereich der Lipidmediatoren in vielen Bereichen nicht vollständig geklärt sind, wurden weitere Lipide als potentielle Targets in Betracht gezogen.

Leukotriene (LT) sind wichtige Lipidmediatoren, die durch Oxygenierung von Arachidonsäure entstehen. Sie nehmen eine zentrale Rolle ein in der Entstehung und dem Voranschreiten von Entzündungen, allergischen Reaktionen, Asthma, kardiovaskulären Erkrankungen und auch bei Krebserkrankungen. Das Schlüsselenzym der LT-Biosynthese ist das Enzym 5-Lipoxygenase (5-LO). Zur Behandlung von LT-assoziierten Krankheiten sind bis heute nur zwei Wirkstoffe zugelassen, die in den LT-Stoffwechsel eingreifen: zum einen der Cys-LT-Rezeptorantagonist Montelukast (Singulair®) und zum anderem der eisenchelatisierende 5-LO-Inhibitor Zileuton (Zyflo®, nur in den USA zugelassen). Es besteht daher ein großer Bedarf an neuen, selektiven Liganden.

C06 (Abbildung 61) ist einer der am besten charakterisierten Vertreter einer neue Klasse an potenten, direkten und selektiven 5-LO-Inhibitoren: den Aryliden-Aryl-Thiazolonen, die ein großes Potential für die Entwicklung neuer anti-Leukotrien Arzneistoffe aufweisen. *In-vivo*-Experimente haben jedoch gezeigt, dass **C06** und seine Derivaten nicht optimale pharmakologische Profile besitzen und zudem nur in geringem Maße im Wässrigen löslich sind. Die bisher erforschte Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) beschränkt sich auf Substituenteneffekte und weist einen kontinuierlichen, flachen Charakter auf.



- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> → IC₅₀ (S100) = 300 nM ✓ → IC₅₀ (PMNL) = 660 nM ✓ → hohe Plasmabindung (44% 5-LO Aktivität bei 10 μM) ✗ | <ul style="list-style-type: none"> → nicht toxisch ✓ → Löslichkeit in PBS 30 μM ✗ → Derivate: kontinuierliche SAR ✗ |
|---|--|

Abbildung 61: C06 und seine pharmakologischen Eigenschaften

Zu Beginn der Arbeit wurden ausgehend von der literaturbekannten Drei-Komponenten-onepot-Synthese zwischen einem aromatischen Aldehyd, einem aromatischen Nitril und Thioglykolsäure bzw. der verwandte zweistufigen Synthese (Kondensation zwischen einem aromatischen Aldehyd und einem Arylthiazol-4(5H)-on), jeweils mikrowellenassistierte Synthesen zum Aufbau der Aryliden-Aryl-Thiazolonen etabliert, optimiert und weitere Syntheserouten evaluiert. Durch die Durchführung der Aryliden-Aryl-Thiazolonsynthesen in der Mikrowelle konnte die Reaktionszeit von 1-12 Stunden auf 5 bis 15 Minuten verkürzt werden. Aufgrund der verminderten Bildung von Neben- und Zerfallsprodukten durch die verkürzte Reaktionszeit wird auch die Isolierung und Aufreinigung erleichtert.

Zur Steigerung der Löslichkeit der Aryliden-Aryl-Thiazolone in wässrigen Systemen und zur weiteren Erforschung der SAR wurde einige Derivate mit polaren Substituenten, unterschiedlichen Wasserstoffbrückenbindungs-Eigenschaften und Morpholinderivate (Abbildung 62) synthetisiert, wobei die Morpholineinheit die Wasserlöslichkeit verbessern sollte. Außerdem wurden verschiedene heteroaromatische Aryliden-Aryl-Thiazolone hergestellt, die aufgrund ihrer niedrigeren, berechneten Lipophilie (clogP) und höheren berechneter Löslichkeit (clogS) ausgewählt wurden. Die Mikrowellensynthese erfolgte entweder über den zweistufigen Weg oder durch die Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion mit teilweise synthetisierten Bausteinen. Dabei zeigte sich zum einen, dass die mit ca. 30% Ausbeute ablaufenden Drei-Komponenten-Reaktion mitunter mehrere, verschiedene Aufreinigungsschritte erfordert und zum anderen, dass elektronenarme Heteroarylnitrile aufgrund ihrer zu hohen Reaktivität nicht zum Aufbau der entsprechenden Aryliden-Aryl-Thiazolone geeignet sind.

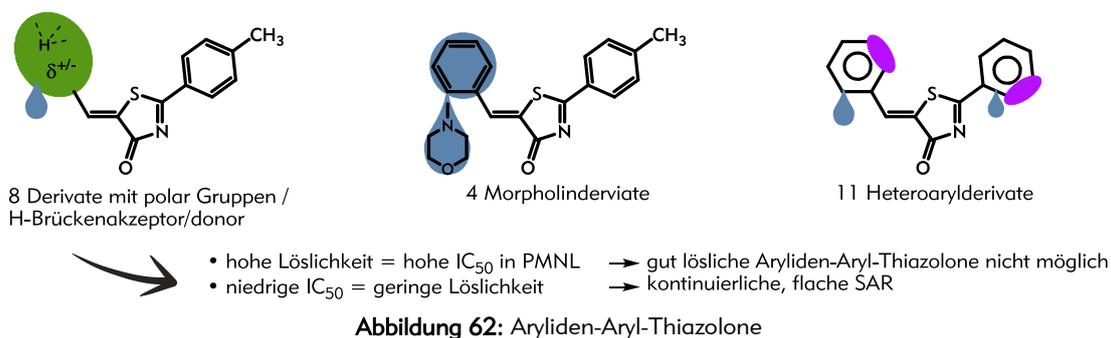


Abbildung 62: Aryliden-Aryl-Thiazolone

Für alle synthetisierten Aryliden-Aryl-Thiazolone wurde von Frau Carmen Rödl (Arbeitskreis Prof. Steinhilber) die Inhibition der 5-LO-Produktbildung unter zellfreien (S100) und unter zellulären Bedingungen (PMNL) bestimmt. Zudem wurden für einige Derivate die experimentellen Löslichkeiten in DMSO und in Puffer grob ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass alle besser löslichen Derivate einen höheren IC_{50} -Wert im zellbasierten Assay aufweisen bzw. die potentesten Substanzen nicht gut im Wässrigen löslich sind. Das Sulfonamidderivat **ST-1742** beispielsweise ist bis zu $80 \mu\text{M}$ in PBS-Puffer löslich, weist aber nur einen IC_{50} -Wert von $1.44 \mu\text{M}$ im PMNL-Assay auf ($0.25 \mu\text{M}$ im zellfreien Assay). Der Benzoesäuremethylester **ST-1685** hingegen ist ein sehr potenter 5-LO-Inhibitor (IC_{50} (S100) = $0.16 \mu\text{M}$, IC_{50} (PMNL) = $0.69 \mu\text{M}$), der aber nur schlecht löslich ist ($30 \mu\text{M}$ in PBS). Trotz niedrigerer clogP- und höherer clogS-Werte als **C06** sind die meisten Heteroaryl-derivate nicht besser wasserlöslich und/oder weisen ebenfalls hohe IC_{50} -Werte im PMNL-Assay auf. Die verschiedenen Pyridinderivate besitzen im zellfreien Assay IC_{50} -Werte um $0.5 \mu\text{M}$ und im PMNL um $2 \mu\text{M}$, während die Löslichkeiten im PBS-Puffer zwischen 10 und $80 \mu\text{M}$ variieren. Die Morpholinderivate zeigen ein ähnliches Verhalten, wobei die Löslichkeit maximal bei $50 \mu\text{M}$ liegt. Das methylierte Pyridiniumderivat **ST-1687** ist in hohen Konzentrationen im Wässrigen löslich, besitzt aber so gut wie keine 5-LO-Aktivität. Sowohl die polaren, als auch die Heteroaryl-derivate spiegeln die bekannte, kontinuierliche SAR wieder, wobei sich bei den Heteroaromaten zeigte, dass ein Wasserstoffbrücken-Donor, z.B. in Form eines Pyrrols, die 5-LO-Aktivität negativ beeinflusst. Die Ergebnisse sind zudem in Einklang mit der von Ford-Hutchinson *et al.*^[192] aufgestellten These, dass eine hohe Lipophilie eine Charakteristikum von vielen potenten 5-LO-Inhibitoren ist.

Zur Charakterisierung der unbekannt, allosterischen Bindestelle der Aryliden-Aryl-Thiazolone wurde eine Reihe von zum kovalenten bzw. zum Photoaffinity-Labeling fähigen Aryliden-Aryl-Thiazolonderivate synthetisiert - zwei Derivaten zum kovalenten Labeling, ein aromatisches Azid und verschiedenartig verknüpfte Benzophenonderivate.

7. Zusammenfassung

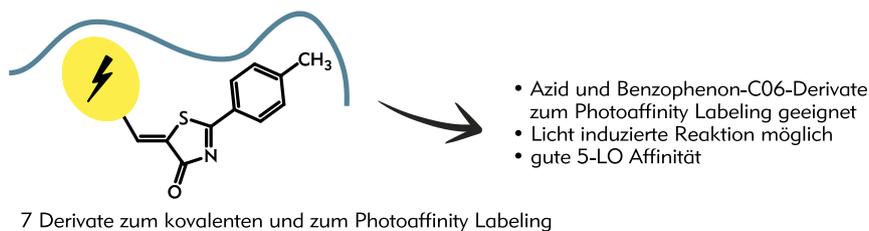


Abbildung 63: Kovalentes und Photoaffinity-Labeling

Alle Derivate wiesen gute bis sehr gute 5-LO Affinitäten auf (S100: 0.06 – 0.3 μM ; PMNL: 0.3-2.27 μM). In den durchgeführten wash-out-Versuchen konnte bisher keine signifikante kovalente Inhibition festgestellt werden. Bei den photoaktiven Benzophenonderivaten und dem Arylazid konnte allerdings eine durch Bestrahlung im jeweiligen Absorptionsmaximum induzierte Reaktion nachgewiesen werden. Folglich konnte gezeigt werden, dass die dargestellten Benzophenonderivate und das Arylazid prinzipiell zum Photoaffinity-Labeling geeignet.

Da sowohl die polaren als auch die heteroaryl-basierten Aryliden-Aryl-Thiazolone die kontinuierliche SAR widerspiegeln und keine hohe Wasserlöslichkeit bei gleichzeitiger hoher 5-LO-Inhibition erreicht werden konnte, wurden als Nächstes die einzelnen Elemente des Aryliden-Aryl-Thiazolgrundgerüsts und als Folge daraus die Arylidenstruktur variiert (Abbildung 64).

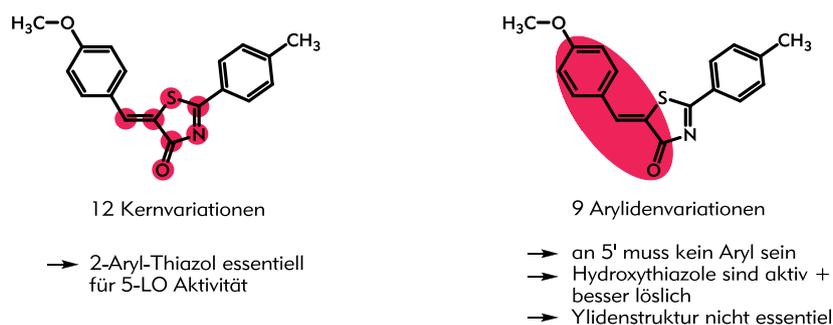


Abbildung 64: Variationen der Aryliden-Aryl-Thiazolgrundstruktur und der Arylideneinheit

Die jeweils in individuellen Synthesen hergestellten Kernvariationsderivate, wie zum Beispiel Furanon (ST-1501) oder Oxazolone (ST-1745) sowie Derivate mit Substitutionen am Kern und andersartiger Verknüpfung der Aryliden-Arylreste (z.B. ST-1690, ST-1751 oder ST-1749), zeigten durch ihr fehlendes bzw. sehr niedriges 5-LO-Inhibitionspotential, dass die 2-Arylthiazol-Grundstruktur wichtig für die 5-LO-Inhibition durch die Aryliden-Aryl-Thiazolone ist. Der simple Austausch des Schwefels in C06 durch Sauerstoff (ST-1750) oder der Austausch des Benzylidenkohlenstoff gegen Stickstoff (ST-1693) führte zu zellbasierten IC_{50} -Werten von über 10 μM bzw. zum kompletten Aktivitätsverlust im Fall einiger Heterozyklenvarianten.

Die an der Arylidenstruktur substituierten Derivate ST-1635 und ST-1757, die im Zuge der weiteren Modifikationen synthetisiert wurden, zeigten ebenfalls nur eine sehr schwache 5-LO-Aktivität. Die Einführung von aliphatischen Resten an der 5-Position des Thiazolons wurde hingegen sehr gut toleriert (IC_{50} -Werte zwischen 0.12 und 1.56 μM). Die Cyclohexylderivate ST-1688 und ST-1827 zeigten, dass Hydroxythiazole 5-LO aktiv sind und sie weisen zudem gesteigerte Löslichkeiten auf. Durch das an der Doppelbindung „hydrierte“ C06-Derivat ST-1741 und das entsprechende Diarylhydroxythiazolanalogon ST-1700 wurde deutlich, dass die Ylideneinheit nicht essentiell für die 5-LO-Aktivität ist - beide Hydroxythiazole weisen submikromolare IC_{50} -Werte auf und die gesteigerte Löslichkeiten der Hydroxythiazole (Abbildung 65). Für ST-1741 wurde eine eigene Synthesestrategie über substituierte Thioglykolsäure entwickelt.

7. Zusammenfassung

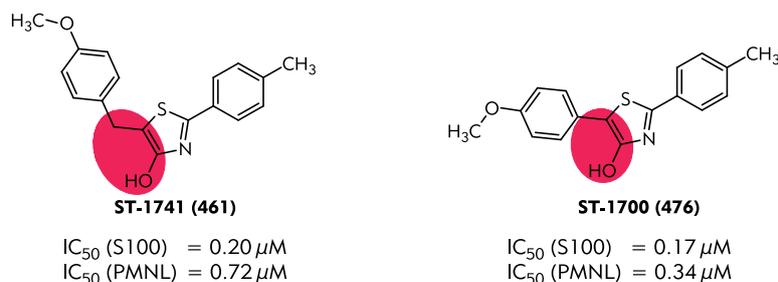


Abbildung 65: Durch Variation von **C06** entwickelte Strukturen

Die 2,5-Diarylthiazol-4-ole und die neu erschlossenen Leitstruktur der 2-Aryl-5-Arylmethylthiazol-4-ole wurden basierend auf den Substituenteneffekten aus den bisher durchgeführten SAR-Studien weiterentwickelt. (Die Diarylhydroxythiazole sind literaturbekannte 5-LO-Inhibitoren, wobei die literaturbeschriebenen inhibitorischen Affinitäten^[418] niedriger sind als die der hier beschriebenen Derivate. Zudem sind die hier beschriebenen Derivate nicht literaturbekannt.) Durch den Austausch des Substituenten am 3'-Phenylring von Methyl zu Chlor konnte die Affinität der Hydroxythiazole um mehr als das Sechsfache (**ST-1829**) bzw. Dreifache (**ST-1748**) gesteigert werden (Abbildung 66). 5-(4-Chlorbenzyl)-2-p-tolylthiazol-4-ol (**ST-1829**) weist einen IC₅₀-Wert von 30 nM im zellfreien Assay und 140 nM in PMNL auf. 2-(4-Chlorphenyl)-5-(4-methoxyphenyl)thiazol-4-ol (**ST-1748**) besitzt sogar einen noch niedrigeren IC₅₀-Wert im zellbasierten Assay (10 nM), während der IC₅₀-Wert im S100 etwas höher ist (50 nM). Beide Derivate behalten in Gegenwart von 10% fetalem Kälberserum (FSC) ihre inhibitorische Wirkung, was für eine geringe Plasmabindung spricht. Bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM bzw. 1 μM beträgt die 5-LO Restaktivität nur 11% bzw. 25% für **ST-1829** bzw. **ST-1748**, während sie im Falle von **C06** bei 10 μM auf über 44% steigt. Sowohl **ST-1748** als auch **ST-1829** haben keinen Einfluss auf die Zellvitabilität und Integrität der Zellmembran. Wie auch die anderen getesteten Derivate zeigten sie keinerlei Zelltoxizität (WST-1 und LDH-Ausfluss). Im Gegensatz zu **C06** ist **ST-1748** in wässrigem Puffer immerhin bis zu 50 μM löslich (**C06** nur bis 30 μM) und **ST-1829** sogar bis zu 80 μM. In DMSO sind die Löslichkeiten der 2-Aryl-5-Arylmethylthiazol-4-ol-Derivat (**ST-1741** und **ST-1829**) um eine Größenordnung höher als die von **C06** (100 μM vgl. mit 10 μM für **C06**).

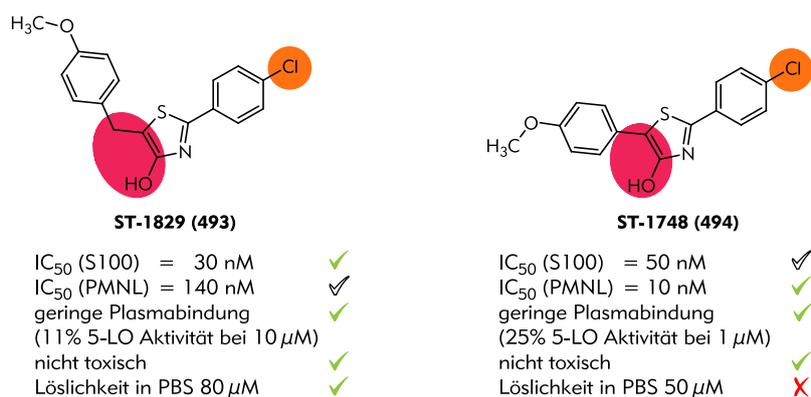


Abbildung 66: **ST-1829** und **ST-1748**

Die Variation des Thiazolonkerns und der Arylideneinheit hat die SAR der Aryliden-Aryl-Thiazolone deutlich erweitert und konnte die für die 5-LO-Aktivität wichtigen Elemente identifizieren. Dadurch ist es gelungen, die 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-ole als 5-LO-Leitstruktur zu erschließen, die sowohl unter zellfreien Bedingungen (S100) als auch im zellbasierten Assay (PMNL) Aktivitäten im nanomolaren Bereich erreichen. Die Aktivität des nicht toxischen, sehr

potenten und direkten 5-LO-Inhibitoren **ST-1829** (und auch die von **ST-1748**) bleibt zudem in Anwesenheit von Blutplasma (FCS) erhalten. Mit den 2-Aryl-5-arylmethylthiazol-4-olen als weiterentwickelte Leitstruktur konnte außerdem die Löslichkeit in DMSO und vor allem im Wässrigen, verglichen zu **C06**, deutlich erhöht werden. Mit **ST-1829** wurde ein **C06**-Analogon hergestellt, das die Nachteile im pharmakologischen Profil von **C06** eliminiert und zu einem neuen, effektiven Wirkstoff in der anti-Leukotrien Therapie weiter entwickelt werden kann.

8. Experimenteller Teil

Für die Synthesen und analytischen Verfahren wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Kieselgelfolien 60 F254 mit einer Schichtdicke von 0,2 mm (Merck, Darmstadt). Zur Detektion wurden Standardmethoden verwendet (UV-Licht, ethanolische Ninhydrin-Lösung oder ethanolische Molybdätdi-phosphorsäure-Lösung)

Säulenchromatographie

- Säulen-Füllmaterial: Kieselgel der Korngröße 63-200 μm (Merck, Darmstadt). Das verwendete Fließmittel ist jeweils angegeben.
- IntelliFlash 310 Flash Chromatography Workstation mit Column Station (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA)

Mikrowellensynthese

- Biotage Initiator 2.0 (Biotage AB, Schweden)
- CEM Discover (CEM Corporation, USA)

Massenspektrometrie

- Elektro-Spray-Ionisations-MS (ESI-MS): VG Platform II (Fisons Instruments, Manchester, UK).
- nano-Elektro-Spray-Ionisations (ESI-MS): Mariner Workstation TOF (Applied Biosystems, Carlsbad, USA).
- Hochauflösende MS (HR-MS): LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

- ^1H -NMR: Bruker AM 250 Spektrometer (250 MHz) (Bruker, Reinstädten).
- ^1H -NMR: Bruker DPX 250 Spektrometer (250 MHz) (Bruker, Reinstädten).
- ^1H -NMR: Bruker AV 300 Spektrometer (300 MHz) (Bruker, Reinstädten).
- ^1H -NMR: Bruker AV 400 Spektrometer (400 MHz) (Bruker, Reinstädten).

UV-/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

- Jasco UV-530 Spektrophotometer (Jasco Corp.)
- Evolution 300 BB UV-Vis-Spektrophotometer (Thermo Scientific Inc.)
- Aminco-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (SLM-Aminco)
- Hitachi Fluorescence Spektrophotometer F-4500 (Hitachi Corp.).

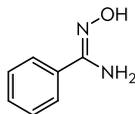
Materialien

Alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von VWR (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Alfa Aesar (Ward Hill MA, USA), ABCR (Karlsruhe, Deutschland) und Acros Organics (Geel, Belgien) bezogen und ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt sofern nicht anders angegeben.

8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

(Z)-N'-Hydroxybenzamidin (191)^[271]

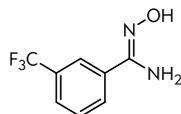


Eine Suspension aus 10.0 g Benzonnitril (**190**) (96.97 mmol, 1.0 eq), 8.76 g Hydroxylaminhydrochlorid (126.05 mmol, 1.3 eq) und 13.36 g Natriumcarbonat (126.05 mmol, 1.3 eq) in 100 mL abs. Ethanol wird für 17 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach drei Stunden werden erneut 1.3 eq Hydroxylaminhydrochlorid und 1.3 eq Natriumcarbonat zugegeben.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der anorganische Feststoff abfiltriert und das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Das entstanden farblose Öl wird nach kurzer Zeit fest.

Ausbeute:	13.2 g (quant.)
Summenformel:	C ₇ H ₈ N ₂ O
Molmasse:	136.15 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.3 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.61 (s, 1H, OH), 7.68-7.65 (m, 3H, 2H,6H-Ph), 7.35-7.38 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 5.79 (s, 2H, NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 136.6 [M+H] ⁺

(Z)-N'-Hydroxy-3-(trifluormethyl)benzamidin (197)^[271]

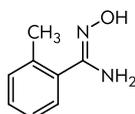


Eine Suspension aus 2.35 mL 3-(Trifluormethyl)benzonnitril (**196**) (17.53 mmol, 1.0 eq), 1.58 g Hydroxylaminhydrochlorid (22.79 mmol, 1.3 eq) und 2.42 g Natriumcarbonat (22.79 mmol, 1.3 eq) in 20 mL abs. Ethanol wird für 22 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach zwei Stunden werden erneut 1.3 eq Hydroxylaminhydrochlorid und 1.3 eq Natriumcarbonat zugegeben.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der anorganische Feststoff abfiltriert und das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Das entstanden gelbliche Öl wird nach kurzer Zeit fest.

Ausbeute:	3.6 g (quant.)
Summenformel:	C ₈ H ₇ F ₃ N ₂ O
Molmasse:	204.15 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.50 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.90 (s, 1H, 2H-PhCF ₃), 7.82 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 6H-PhCF ₃), 7.68 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 4H-Ph CF ₃), 7.53 (t, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 5H-Ph CF ₃), 4.92 (br s, 2H, NH ₂), 1.89 (s, 1H, OH).
ESI-MS:	m/z = 204.6 [M+H] ⁺

(Z)-N'-Hydroxy-3-(trifluormethyl)benzamidin (201)^[271]



Eine Suspension aus 5.0 mL 2-Methylbenzonnitril (**200**) (42.68 mmol, 1.0 eq), 3.78 g Hydroxylaminhydrochlorid (54.38 mmol, 1.3 eq) und 5.76 g Natriumcarbonat (54.38 mmol, 1.3 eq) in 40 mL abs. Ethanol

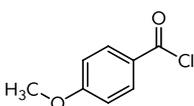
8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

wird für 16 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach zwei Stunden werden erneut 1.3 eq Hydroxylaminhydrochlorid und 1.3 eq Natriumcarbonat zugegeben.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der anorganische Feststoff abfiltriert und das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	3.95 g (63%)
Summenformel:	C ₈ H ₁₀ N ₂ O
Molmasse:	150.18 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.23 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.31 (s, 1H, OH), 7.30-7.18 (m, 4H, 3H,4H,5H, 6H-Tolyl), 5.71 (br s, 2H, NH ₂), 2.34 (s, 3H, CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 150.6 [M+H] ⁺

4-Methoxybenzoylchlorid (193)^[452]

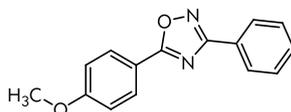


Eine Mischung aus 2.00g 4-Methoxybenzoesäure (**192**) (13.15 mmol, 1.0 eq), 4.8 mL Thionylchlorid (65.73 mmol, 5.0 eq) und 8 mL abs. Toluol wird für 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach kurzer Zeit bildet sich eine klare Lösung.

Das Lösemittel und das überschüssige Thionylchlorid werden im Vakuum entfernt. Das Säurechlorid wird ohne weitere Aufreinigung und Analytik umgesetzt.

Ausbeute:	2.24 g (quant. angenommen)
Summenformel:	C ₈ H ₇ ClO ₂
Molmasse:	170.59 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl

5-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (194)^[272]



Methode 1:

Zu einer Lösung aus 4.48 g 4-Methoxybenzoylchlorid (**193**) (26.29 mmol, 1.0 eq) in 30 mL abs. Pyridin werden 4.22 g (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (30.99 mmol, 1.18 eq) gegeben und die feststoffhaltige Lösung wird für 24 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösungsmittel der orange-gelben Reaktionslösung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert. Das feste Rohprodukt wird abgesaugt und mit Ethanol nachgewaschen. Aus dem Filtrat fällt nach einiger Zeit weiteres Produkt aus.

Methode 2: Mikrowellensynthese nach^[273]

Eine Lösung aus 1.12 g *para*-Methoxybenzoesäure (**192**) (7.35 mmol, 1.0 eq), 1.35 g HOBt*H₂O (8.81 mmol, 1.2 eq), 1.55 g EDC*HCl (8.08 mmol, 1.1 eq) in 8 mL abs. DMF wird bei Raumtemperatur ca. eine Stunde gerührt.

Dann wird eine Lösung aus 1.0 g (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (7.34 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle 20 min bei 180 °C erhitzt.

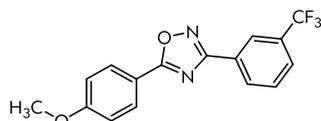
Die gelbliche Mischung wird auf ca. 50 mL Eiswasser gegeben wobei ein weißer voluminöser Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 45 min lange gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und lyophilisiert.

Ausbeute:	<u>Methode 1:</u> 4.98 g (75%)
	<u>Methode 2:</u> 1.43 g (77%)

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

<i>Summenformel:</i>	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂
<i>Molmasse:</i>	252.27 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL389, ST-1422
<i>R_f-Wert:</i>	0.71 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 8.17 (d, 4H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-Ph, 2H,6H-Ph-OMe), 7.52-7.50 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.04 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-OMe), 3.91 (s, 3H, -OCH ₃).
<i>¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 175.2, 168.0, 163.0, 131.5, 129.8, 129.1, 127.0, 126.2, 115.6, 114.9, 55.6.
<i>Schmelzpunkt:</i>	95.4 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 253.0 [M+H] ⁺
<i>MALDI-HRMS:</i>	Ber.: m/z = 253.09715 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 253.09753 [M+H] ⁺ (Δ: 1.5 ppm)
<i>CHN:</i>	Ber.: C 71.41, H 4.79, N 11.10 Gef.: C 71.23, H 4.76, N 11.03

5-(4-Methoxyphenyl)-3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol (198)^[272]



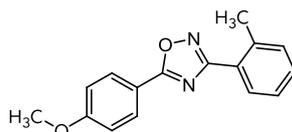
Zu einer Lösung aus 2.20 g 4-Methoxybenzoylchlorid (**193**) (12.89 mmol, 1.0 eq) in 20 mL abs. Pyridin werden 3.11 g (*Z*)-*N'*-Hydroxy-3-(trifluormethyl)benzamidin (**197**) (15.23 mmol, 1.18 eq) gegeben und die feststoffhaltige Lösung wird für 20 Stunden zum Sieden erhitzt.

Der orangenen Reaktionslösung werden nach Abkühlen auf Raumtemperatur ca. 25 mL Ethanol zugesetzt, woraufhin sich ein weißer voluminöser Feststoff bildet, der abgesaugt und mit Ethanol nachgewaschen wird. Aus dem Filtrat fällt nach einiger Zeit weiteres Produkt aus.

<i>Ausbeute:</i>	2.64 g (64%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₆ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂
<i>Molmasse:</i>	320.37 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer, baumwollähnlicher Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL195, ST-1420
<i>R_f-Wert:</i>	0.63 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 8.37 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 2H-PhCF ₃), 8.31 (s, 1H, 6H-Ph), 8.16 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph-OMe), 8.01 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 4H-Ph), 7.85 (t, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 5H-PhCF ₃), 7.20 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-OMe), 3.89 (s, 3H, -OCH ₃).
<i>¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 175.7, 167.16, 163.3, 131.0, 130.7, 130.1, 129.7, 128.2, 127.4, 125.9, 123.4, 115.4, 115.0, 55.7.
<i>Schmelzpunkt:</i>	128 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 320.9 [M+H] ⁺
<i>MALDI-HRMS:</i>	Ber.: m/z = 321.08454 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 321.08486 [M+H] ⁺ (Δ: 0.9 ppm)
<i>CHN:</i>	Ber.: C 60.00, H 3.46, N 8.75 Gef.: C 59.96, H 3.50, N 8.65

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

5-(4-Methoxyphenyl)-3-o-tolyl-1,2,4-oxadiazol (202)^[272]

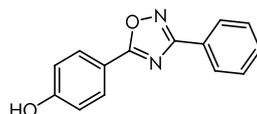


Zu einer Lösung aus 2.20 g 4-Methoxybenzoylchlorid (**193**) (12.89 mmol, 1.0 eq) in 20 mL abs. Pyridin werden 2.29 g (Z)-N'-Hydroxy-2-methylbenzamidin (**201**) (15.23 mmol, 1.18 eq) gegeben und die feststoffhaltige Lösung wird für 16 Stunden zum Sieden erhitzt.

Der orangenen Reaktionslösung werden nach Abkühlen auf Raumtemperatur ca. 25 mL Ethanol zugesetzt, woraufhin sich ein weißer Feststoff bildet, der abgesaugt und mit Ethanol nachgewaschen wird. Aus dem Filtrat fällt nach einiger Zeit weiteres Produkt aus.

<i>Ausbeute:</i>	2.85 g (83%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ *1 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	266.30 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL201, ST-1421
<i>R_F-Wert:</i>	0.64 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 8.13 (d, 1H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-Ph-OMe), 7.99 (d, 1H, ³ J = 8.8 Hz, 6H-Tolyl), 7.52-7.37 (m, 3H, 3H,4H, 5H-Tolyl), 7.20 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-OMe), 3.88 (s, 3H, -OCH ₃), 2.60 (s, 3H, -CH ₃).
<i>¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 174.2, 168.6, 163.0, 137.4, 131.3, 130.8, 129.8, 129.6, 126.1, 125.6, 115.6, 114.9, 55.6, 21.5.
<i>Schmelzpunkt:</i>	89.5 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 267.0 [M+H] ⁺
<i>MALDI-HRMS:</i>	Ber.: m/z = 267.11146 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 267.11296 [M+H] ⁺ (Δ: 5.6 ppm)
<i>CHN:</i>	Ber.: C 70.97, H 5.40, N 10.34 Gef.: C 70.65, H 5.42, N 10.75

4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (195)^[272]



Zu einer Lösung aus 1.50 g 5-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**194**) (5.95 mmol, 1.0 eq) in 20 mL abs. Dichlormethan werden bei - 30 °C (im Kältebad Aceton und flüssiger Stickstoff) 2.3 mL Bortribromid (23.80 mmol, 4.0 eq) zugegeben. Die feststoffhaltige Mischung wird 16 Stunden lang gerührt ohne die Kühlung zu erneuern.

Der Reaktionsmischung werden vorsichtig ca. 25 mL Wasser zugesetzt, wobei es zur lebhaften Gasentwicklung kommt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und dreimal mit je ca. 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten klaren organischen Phasen werden mit je einmal mit ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

<i>Ausbeute:</i>	1.39 g (quant.)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂
<i>Molmasse:</i>	238.24 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißlicher Feststoff
<i>R_F-Wert:</i>	0.54 (Hex/EE 1:1)

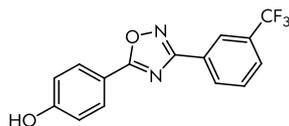
8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.56$ (br s, 1H, HO-), 8.09-8.02 (m, 4H, 2H,6H-Ph + 3H,5H-Ph-OH), 7.60 (br s, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.00 (d, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 2H,6H-Ph-OH).
ESI-MS: $m/z = 238.7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

Das Rohprodukt kann durch Säulenchromatographie (Hexan:Ethylacetat 3:1) weiter aufgereinigt werden.

Aussehen: weißer Feststoff
Bezeichnung: AL397, ST-1425
 R_f -Wert: 0.20 (Hex/EE 3:1)
 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.57$ (br s, 1H, HO-), 8.10-8.02 (m, 4H, 2H,6H-Ph + 3H,5H-Ph-OH), 7.61-7.57 (m, 3H, 3H, 4H, 5H-Ph), 7.00 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2H,6H-Ph-OH).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 175.4, 167.9, 162.0, 131.4, 130.0, 129.1, 126.9, 126.3, 116.2, 114.0$.
Schmelzpunkt: 174.3 °C
ESI-MS: $m/z = 236.7$ $[\text{M}-\text{H}]^-$
MALDI-HRMS: Berechnet: $m/z = 239.08150$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
Gefunden: $m/z = 239.08191$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Δ : 1.7 ppm)

4-(3-(3-(Trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (199)^[272]



Zu einer Lösung aus 600 mg 5-(4-Methoxyphenyl)-3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol (**198**) (1.87 mmol, 1.0 eq) in 7 mL abs. Dichlormethan werden bei -30 °C (im Kältebad Aceton und flüssiger Stickstoff) 7.5 mL einer 1M Bortribromid-Lösung in Dichlormethan (7.49 mmol, 4.0 eq) zugegeben. Die feststoffhaltige Mischung wird über eine Stunde auf Raumtemperatur kommen lassen und anschließend für 2 Tage zum Sieden erhitzt.

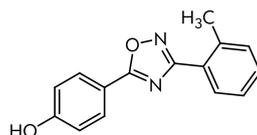
Der braunen Reaktionsmischung werden vorsichtig ca. 20 mL Wasser zugesetzt, wobei es zur lebhaften Gasentwicklung kommt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und dreimal mit je ca. 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten klaren organischen Phasen werden mit je einmal mit ca. 100 mL ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das mit Edukt (0.26 g, 43%) verunreinigte Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 370 mg (64% (quant. bezogen auf re-isolierte Edukt))
Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$
Molmasse: 306.24 g/mol
Aussehen: weißer Feststoff
 R_f -Wert: 0.54 (Hex/EE 1:1)
 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.56$ (br s, 1H, HO-), 8.09-8.02 (m, 4H, 2H,6H-Ph CF_3 + 2H,6H-Ph-OH), 7.60 (br s, 3H, 3H,4H,5H-Ph CF_3), 7.00 (d, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 3H,5H-Ph-OH).
ESI-MS: $m/z = 238.7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

4-(3-o-Tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (203)^[272]



Zu einer Lösung aus 1.00 g 5-(4-Methoxyphenyl)-3-o-tolyl-1,2,4-oxadiazol (**202**) (3.76 mmol, 1.0 eq) in 15 mL abs. Dichlormethan werden bei -30 °C (im Kältebad Aceton und flüssiger Stickstoff) 1.45 mL Bortribromid (10.38 mmol, 4.0 eq) zugegeben. Die feststoffhaltige Mischung wird 16 Stunden gerührt ohne die Kühlung zu erneuern.

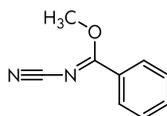
Der Reaktionsmischung werden vorsichtig ca. 25 mL Wasser zugesetzt, wobei es zur lebhaften Gasentwicklung kommt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und dreimal mit je ca. 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten klaren organischen Phasen werden mit je einmal mit ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	0.93 g (98%)
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂
Molmasse:	252.27 g/mol
Aussehen:	kristalliner Feststoff
Bezeichnung:	AL212, ST-1424
R _F -Wert:	0.54 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.5 (br s, 1H, HO-), 8.05-7.97 (m, 4H, 2H,6H-Ph + 3H,5H-Ph-OH), 7.51-7.43 (m, 3H, 3H, 4H, 5H-Ph), 7.00 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-OH), 2.59 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 174.5, 168.7, 162.0, 137.5, 131.4, 130.8, 130.1, 129.7, 126.2, 125.8, 116.3, 114.2, 21.6.
Schmelzpunkt:	185 °C
ESI-MS:	m/z = 250.9 [M-H] ⁻

Das Produkt kann durch Umkristallisieren aus Ethylacetat weiter aufgereinigt werden.

MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 253.09715 [M+H] ⁺
	Gef.: m/z = 253.09765 [M+H] ⁺ (Δ: 1.9 ppm)

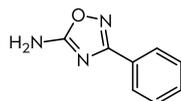
Methyl N-cyanobenzimidat (258)^[302]



Eine Mischung aus 0.59 g Cyanamid (**256**) (14.11 mmol, 1.0 eq), 2.50 mL Trimethoxymethylbenzol (14.11 mmol, 1.00 eq) in 2.56 mL Essigsäureanhydrid (28.21 mmol, 2.0 eq) wird für 45 Minuten auf 135 °C erhitzt.

Die entstandene Essigsäure wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (4:1) aufgereinigt.

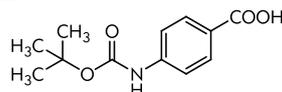
Ausbeute:	2.06 g (91%)
Summenformel:	C ₉ H ₈ N ₂ O
Molmasse:	160.17 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _F -Wert:	0.46 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.07 (d, 2H, ³ J = 7.6 Hz, 2H,6H-Ph), 7.63 (t, 1H, ³ J = 7.4 Hz, 4H-Ph), 7.52 (t, 2H, ³ J = 7.6 Hz, 3H,5H-Ph), 4.06 (s, 3H, -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 160.5 [M+H] ⁺

3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-amin (259)^[302]

Eine Mischung aus 750 mg Methyl *N*-Cyanobenzimidat (**258**) (4.68 mmol, 1.0 eq), 342 mg Hydroxylaminhydrochlorid (4.92 mmol, 1.05 eq), 0.65 mL Triethylamin (4.86 mmol, 1.0 eq) in 15 mL abs. Methanol wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt.

<i>Ausbeute:</i>	476 mg (36%) 301 mg (23%) 5-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-amin (260)
<i>Summenformel:</i>	C ₉ H ₈ N ₂ O
<i>Molmasse:</i>	160.17 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weiße, kristalline Feststoffe
<i>R_F-Wert:</i>	0.48 (259) und 0.41 (260) (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	259: δ = 7.98-7.93 (m, 2H, 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Ph), 7.52-7.41 (m, 3H, 3 <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Ph), 5.68 (br s, 2H, -NH ₂). 260: δ = 8.08-8.04 (m, 2H, 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Ph), 7.62-7.47 (m, 3H, 3 <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Ph), 4.46 (br s, 2H, -NH ₂).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 161.6 [M+H] ⁺

4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)benzoesäure (273)^[312]

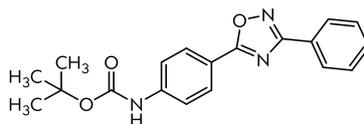
Zu einer Lösung aus 1.0 g para-Aminobenzoesäure (**272**) (7.29 mmol, 1.0 eq) in 20 mL Dioxan, 10 mL Wasser und 2.0 mL Triethylamin (14.58 mmol, 2.0 eq) werden bei Raumtemperatur 3.18 g di-*tert*-Butyldicarbonat (14.6 mmol, 2.0 eq) zugegeben. Die Mischung wird 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel der Reaktionsmischung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand in etwa 30 mL Wasser aufgenommen und mit ca. 20 mL 3M HCl versetzt, woraufhin sich ein weißer Niederschlag bildet der ca. 15 min gerührt wird. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit ca. 25 mL Wasser nachgewaschen.

<i>Ausbeute:</i>	1.66 g (96%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄
<i>Molmasse:</i>	237.25 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer Feststoff
<i>R_F-Wert:</i>	0.22 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-<i>d</i>₆):</i>	δ = 12.59 (br s, 1H, -COOH), 9.73 (s, 1H, -NH-), 7.82 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Ph), 7.55 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Ph), 1.48 (s, 9H, 3x -CH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 235.6 [M-H] ⁻

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

tert-Butyl-4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenylcarbamate (274) nach ^[273]



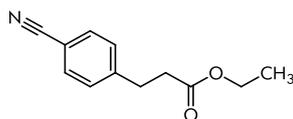
Eine Lösung aus 500 g 4-(tert-Butoxycarbonylamino)benzoesäure (**273**) (2.10 mmol, 1.0 eq), 323 mg HOBt*H₂O (2.10 mmol, 1.0 eq), 404 mg EDC*HCl (2.10 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. DMF wird bei Raumtemperatur ca. eine Stunde gerührt.

Dann wird eine Lösung aus 287 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (7.34 mmol, 1.0 eq) in 2.5 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle 15 min bei 100 °C und 10 min bei 150 °C erhitzt.

Die Mischung wird auf ca. 50 mL Eiswasser gegeben wobei ein weißer voluminöser Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 30 min lange gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und lyophilisiert.

Ausbeute:	709 mg (quant.)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃
Molmasse:	337.37 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.68 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.92 (s, 1H, -NH-), 8.11-8.06 (m, 4H, 3H,5H-Ph- + 2H,6H-Ph), 7.73 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph-), 7.62-7.50 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 1.51 (s, 9H, 3x -CH ₃).

3-(4-Cyanophenyl)propansäureethylester (285)^[316]



Zu einer Mischung aus 1.00 g 4-Brombenzonitril (**283**) (5.49 mmol, 1.0 eq), 2.6 mL 3,3-Diethoxyprop-1-en (16.15 mmol, 3.0 eq), 2.65 mL Tributylamin (10.77 mmol, 2.0 eq) und 1.77 g Tetrabutylammoniumbromid (5.38 mmol, 1.0 eq) in 20 mL abs. DMF werden 36 mg Palladiumdiacetat (0.16 mmol, 0.03 eq) gegeben und die orange Mischung wird für 21 Stunden auf 90 °C erhitzt.

Der Mischung werden ca. 15 mL 2M HCl und ca. 25 mL Wasser zugesetzt und mit ca. 50 mL Et₂O versetzt und diese Mischung über Celite filtriert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird fünfmal mit je ca. 100 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (5:1) vom ebenfalls entstehendem (E)-4-(3-Oxoprop-1-enyl)benzonitril, **286**, getrennt.

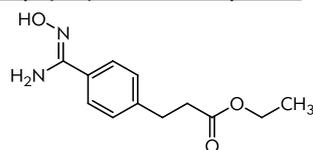
3-(4-Cyanophenyl)propansäureethylester (**285**):

Ausbeute:	1.09 g (88%)
Summenformel:	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂
Molmasse:	204.24 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _f -Wert:	0.24 (Hex:EE 5:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.58 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Ph), 7.32 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 2H,6H-Ph), 4.12 (q, 2H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ CH ₃), 3.00 (t, 2H, ³ J = 7.5 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.63 (t, 2H, ³ J = 7.6 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 1.22 (t, 6H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 203.6 [M+H] ⁺

(*E*)-4-(3-Oxoprop-1-enyl)benzonnitril (**286**):

Ausbeute:	120 mg (14%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₇ NO
Molmasse:	157.17 g/mol
Aussehen:	goldgelber Feststoff
R _F -Wert:	0.12 (Hex:EE 5:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.76 (d, 1H, ³ J = 7.5 Hz, CHO), 7.73 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-Ph), 7.66 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 2H,6H-Ph), 7.48 (d, 1H, ³ J = 16.0 Hz, Ph-CH=CH-CHO), 6.77 (dd, 1H, ³ J = 7.5 Hz, Ph-CH=CH-CHO).
ESI-MS:	m/z = 157.7 [M+H] ⁺

(*Z*)-3-(4-(*N*'-Hydroxycarbamimidoyl)phenyl)propansäureethylester (**289**)^[271]



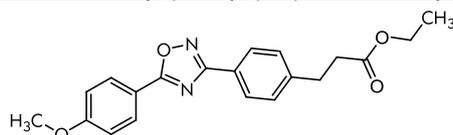
Eine Mischung aus 238 mg 3-(4-Cyanophenyl)propansäureethylester (**285**) (1.17 mmol, 1.0 eq), 106 mg Hydroxylaminhydrochlorid (1.52 mmol, 1.3 eq) und 161 mg Natriumcarbonat (1.52 mmol, 1.3 eq) in 3 mL abs. EtOH wird für 17 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach drei Stunden werden erneut je 1.3 eq Hydroxylaminhydrochlorid und Natriumcarbonat zugegeben.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der anorganische Feststoff abfiltriert und das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wird aus Aceton umkristallisiert und das Filtrat wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (2:1) von der ebenfalls entstehenden (*Z*)-3-(4-(*N*'-Hydroxycarbamimidoyl)phenyl)propansäure abgetrennt.

Ausbeute:	179 mg (65%)
Summenformel:	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃
Molmasse:	236.27 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.20 (Hex:EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 9.55 (s, 1H, -OH), 7.57 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Ph), 7.22 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph), 5.75 (br s, 2H, -NH ₂), 4.03 (q, 2H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ CH ₃), 2.85 (t, 2H, ³ J = 7.5 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.61 (t, 2H, ³ J = 7.5 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 1.15 (t, 6H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 236.8 [M+H] ⁺

3-(4-(5-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäureethylester (**290**)^{nach[273]}



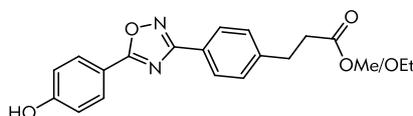
Eine Lösung aus 55 mg 4-Methoxy-Benzoesäure (**192**) (0.36 mmol, 1.0 eq), 55 mg HOBT*H₂O, 65 μL EDC (0.36 mmol, 1.0 eq) in 1 mL abs. DMF wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird eine Lösung aus 85 mg (*Z*)-3-(4-(*N*'-Hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-propansäureethylester (**290**) (0.36 mmol, 1.0 eq) in 1 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle jeweils 10 min bei 100 °C und bei 150 °C erwärmt.

Die Mischung wird auf ca. 10 mL Wasser gegeben und ca. 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene braune Feststoff wird abgesaugt.

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

Ausbeute:	75 mg (59%)
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄
Molmasse:	352.38 g/mol
Aussehen:	grauer Feststoff
R _f -Wert:	0.60 (Hex:EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.13 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-Ph-(CH ₂) ₂ -COOEt), 7.99 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-OMe), 7.45 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Ph-OMe), 7.20 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-Ph-(CH ₂) ₂ -COOEt), 4.04 (q, 2H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ CH ₃), 3.89 (s, 3H, -OCH ₃), 2.94 (t, 2H, ³ J = 7.4 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.68 (t, 2H, ³ J = 7.4 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 1.16 (t, 6H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 353.3 [M+H] ⁺

3-(4-(5-(4-Hydroxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethyl- und Ethylester (291 und 292)^[272]



Methode 1: Gemisch aus 291 und 292

Zu einer Lösung aus 240 mg 3-(4-(5-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäureethylester (**290**) (0.68 mmol, 1.0 eq) in 8 mL abs. Dichlormethan werden bei -30 °C (im Kältebad Aceton und flüssiger Stickstoff) 0.26 mL Bortribromid (2.72 mmol, 4.0 eq) zugegeben. Die feststoffhaltige Mischung wird 16 Stunden gerührt ohne die Kühlung zu erneuern.

Der Reaktionsmischung werden vorsichtig ca. 25 mL Wasser oder MeOH zugesetzt, wobei es zur lebhaften Gasentwicklung kommt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und dreimal mit je ca. 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten klaren organischen Phasen werden mit je einmal mit ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Wird mit Wasser gequench wird eine 1.5:1 Mischung aus Ethyl- (**292**) zu Methylester (**291**) erhalten. Beim Quenchen mit MeOH entsteht mehr des Methylesters (**291**) (1:0.18). Die erhaltene Mischung kann nicht chromatographisch getrennt werden.

Ausbeute:	234 g (quant.)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄ bzw. C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₄
Molmasse:	338.36 g/mol bzw. 324.33 g/mol
Aussehen:	weißlicher Feststoff
R _f -Wert:	0.60 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.55 (br s, 1H, HO-), 8.02 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-(CH ₂) ₂ COOMe/Et), 7.97 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-OH), 7.44 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-OH), 6.99 (2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph-(CH ₂) ₂ COO-Me/Et), 4.04 (q, 2H, ³ J = 7.1 Hz, -COOCH ₂ CH ₃), 3.59 (s, 3H, -COOCH ₃), 2.94 (t, 2H, ³ J = 7.5 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.70 (t, 2H, ³ J = 7.6 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 1.15 (t, 3H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 339.0 [M+H] ⁺ bzw. 324.9 [M+H] ⁺

Methode 2: 291^[272]

Zu einer Lösung aus 634 mg 3-(4-(5-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethylester (**290**) (1.87 mmol, 1.0 eq) in 15 mL abs. Dichlormethan werden bei -30 °C (im Kältebad Aceton und flüssiger Stickstoff) 0.9 mL Bortribromid (9.37 mmol, 5.0 eq) zugegeben. Die feststoffhaltige Mischung wird 16 Stunden gerührt ohne die Kühlung zu erneuern.

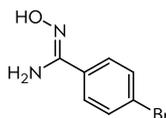
8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Der Reaktionsmischung werden vorsichtig ca. 25 mL MeOH zugesetzt, wobei es zur lebhaften Gasentwicklung kommt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und dreimal mit je ca. 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten klaren organischen Phasen werden mit je einmal mit ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) von nicht umgesetztem Edukt **290** (31 mg (5%)) getrennt.

Ausbeute:	540 g (89%.)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₄
Molmasse:	324.33 g/mol
Aussehen:	weißlicher Feststoff
R _F -Wert:	0.17 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.54 (br s, 1H, HO-), 8.03 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-(CH ₂) ₂ COOMe/Et), 7.97 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-OH), 7.44 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-OH), 6.99 (2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph-(CH ₂) ₂ COO-Me/Et), 3.59 (s, 3H, -COOCH ₃), 2.94 (t, 2H, ³ J = 7.4 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.70 (t, 2H, ³ J = 7.6 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -).
ESI-MS:	m/z = 324.9 [M+H] ⁺

(Z)-4-Brom-N'-hydroxybenzamidin (298)^[453]

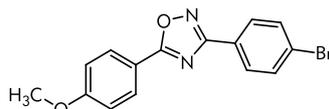


Eine Mischung aus 500 mg 4-Brombenzonnitril (**283**) (2.75 mmol, 1.0 eq), 250 mg Hydroxylaminhydrochlorid (3.57 mmol, 1.3 eq) und 350 mg Natriumhydrogencarbonat (4.12 mmol, 1.5 eq) in 12 mL abs. EtOH wird für 3 Stunden zum Sieden erhitzt.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden der Mischung 10 mL Wasser und 20 mL Ethylacetat zugegeben. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit je 20 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	568 mg (96%)
Summenformel:	C ₇ H ₇ BrN ₂ O
Molmasse:	215.05 g/mol
Aussehen:	hellgelber Feststoff
R _F -Wert:	0.40 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.73 (s, 1H, -OH), 7.62 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph), 7.56 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph), 5.85 (s, 2H, -NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 214.6, 216.5 [M+H] ⁺

3-(4-Bromphenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol (299) nach^[273]



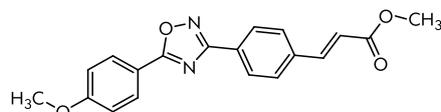
Eine Lösung aus 0.83 g 4-Methoxy-Benzoesäure (**192**) (5.48 mmol, 1.0 eq), 0.92 g HOBt*H₂O (6.03 mmol, 1.1 eq), 1.05 g EDC*HCl (5.48 mmol, 1.0 eq) in 10 mL abs. DMF wird für 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird eine Lösung aus 1.18 g ((Z)-4-Brom-N'-hydroxybenzamidin (**298**)) (5.48 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle jeweils 20 min bei 170 °C erwärmt.

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

Die Mischung wird auf ca. 75 mL Wasser gegeben und ca. 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene weiße Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen.

Ausbeute:	1.27 g (70%)
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₁ BrN ₂ O ₄
Molmasse:	331.16 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.64 (Hex:EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.13 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-PhOMe), 8.02 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 3H,5H-PhBr), 7.81 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 23H,5H-PhBr), 7.20 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.88 (s, 3H, -OCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 331.0, 332.9 [M+H] ⁺

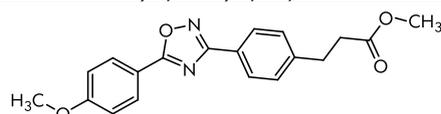
(E)-3-(4-(5-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)acrylsäuremethylester (300) nach^[319,320]



Eine Mischung aus 1.27 g 3-(4-Bromphenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol (**299**) (3.84 mmol, 1.0 eq) in 15 mL Triethylamin wird 10 min mit Argon entgast. Dann werden 47 mg tri-o-Tolylphosphin (0.15 mmol, 0.04 eq), 9 mg Palladiumdiacetat (0.0038 mmol, 0.01 eq) und 0.56 mL Methylacrylat (6.15 mmol, 1.60 eq) zugegeben. Die Suspension wird im verschlossenen Vial für 8 Stunden auf 110 °C erhitzt. Die nach dem Abkühlen festgewordene Mischung wird mit ca. 50 mL 1M KHSO₄-Lösung und 50 mL Wasser versetzt und dreimal mit je ca. 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je ca. 75 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Dichlormethan im Vakuum entfernt. Aus der Triethylamin-Lösung bildet sich beim Abkühlen ein weißer Feststoff, der abgesaugt und erst mit etwas Triethylamin und Hexan nachgewaschen wird.

Ausbeute:	1.27 g (70%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄
Molmasse:	336.34 g/mol
Aussehen:	weißer, voluminöser Feststoff
R _f -Wert:	0.55 (Hex:EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.21-8.16 (m, 4H, 2H,6H-PhOMe + 3H,5H-Ph-CH=CHCOOMe), 7.74 (d, ³ J = 16.0 Hz, Ph-CH=CH-COOMe), 7.66 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Ph-CH=CH-COOMe), 7.05 (d, 2H, ³ J = 9.0 Hz, 3H,5H-PhOMe), 6.53 (d, ³ J = 16.0 Hz, Ph-CH=CHCOOMe), 3.91 (s, 3H, -COOCH ₃), 3.88 (s, 3H, Ph-OCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 337.0 [M+H] ⁺

3-(4-(5-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethylester (301)



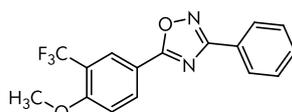
Eine Lösung aus 157 mg (E)-3-(4-(5-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)acrylsäuremethylester (**300**) (0.47 mmol, 1.0 eq) in 50 mL abs. Ethylacetat und einer Spatelspitze Platin auf Charcoal wird für 18 Stunden mit 7 bar Wasserstoff im Autoklav bei 40 °C begast.

Die Reaktionsmischung wird über Celite filtriert und mit Ethylacetat nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Ausbeute:	153 mg (97%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄
Molmasse:	338.36 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.38 (Hex:EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.15 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-PhOMe), 8.08 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Ph-CH ₂ CH ₂ -COOMe), 7.33 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Ph-CH ₂ CH ₂ -COOMe), 7.04 (d, 2H, ³ J = 9.0 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.91 (s, 3H, -COOCH ₃), 3.68 (s, 3H, Ph-OCH ₃), 3.03 (t, ³ J = 7.7 Hz, -CH ₂ CH ₂ -COOMe), 3.03 (t, ³ J = 7.8 Hz, -CH ₂ CH ₂ -COOMe).
ESI-MS:	m/z = 338.9 [M+H] ⁺ , 361.0 [M+Na] ⁺

5-(4-Methoxy-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (305)



Methode 1: Mikrowellensynthese nach [273]

Eine Lösung aus 266 mg 4-Methoxy-3-(trifluormethyl)benzoesäure (**304**) (1.21 mmol, 1.0 eq), 215 mg HOBt*H₂O (1.41 mmol, 1.2 eq), 0.24 mL EDC (1.29 mmol, 1.1 eq) in 4 mL abs. DMF wird bei Raumtemperatur ca. 15 min gerührt.

Dann werden 160 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (1.18 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle 3 Stunden bei 180 °C erwärmt.

Die rot-gelbliche Mischung wird auf ca. 10 mL Eiswasser gegeben wobei ein weißlicher Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 20 min lange gerührt, abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen. Das Rohprodukt in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Methode 2: nach [329]

Eine Lösung aus 479 mg 4-Methoxy-3-(trifluormethyl)benzoesäure (**304**) (2.11 mmol, 1.0 eq), 0.75 mL Thionylchlorid (10.55 mmol, 5.0 eq) in 5 mL Toluol wird für 6 Stunden zum Sieden erhitzt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und noch einmal mit Toluol coevaporiert.

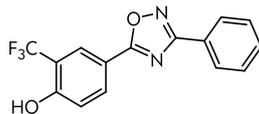
Der Rückstand wird in 5 mL einer 1:1 Mischung aus abs. Pyridin und abs. Toluol gelöst und zu einer Lösung aus 287 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (2.11 mmol, 1.0 eq) in 10 mL einer 1:1 Mischung aus abs. Pyridin und abs. Toluol gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die klargewordene Mischung für 19 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und noch dreimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird aus wenig MeOH umkristallisiert.

Ausbeute:	<u>Methode 1:</u> 260 mg (69%) <u>Methode 2:</u> 600 mg (89%)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂
Molmasse:	320.27 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.66 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.45 (dd, 1H, ³ J = 8.8 Hz, ⁴ J = 2.1 Hz, 6H-PhCF ₃), 8.32 (d, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, 2H-PhCF ₃), 8.12-8.08 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.64-7.54 (m, 4H, 3H,4H,5H-Ph + 5H-PhCF ₃), 4.04 (s, 3H, -OCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 321.3 [M+H] ⁺

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-2-(trifluormethyl)phenol (**306**)



Method 1: ^[272]

Zu einer Lösung aus 203 mg 5-(4-Methoxy-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**305**) (0.63 mmol, 1.0 eq) in 15 mL abs. Dichlormethan werden bei -30 °C (im Kältebad Aceton und flüssiger Stickstoff) 0.24 mL Bortribromid (2.54 mmol, 4.0 eq) zugegeben. Die feststoffhaltige Mischung wird 17 Stunden gerührt ohne die Kühlung zu erneuern.

Der Reaktionsmischung werden vorsichtig ca. 20 mL Wasser zugesetzt, wobei es zur lebhaften Gasentwicklung kommt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und dreimal mit je ca. 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten klaren organischen Phasen werden mit je einmal mit ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Nicht regiertes Edukt wird durch Umkristallisieren aus Aceton abgetrennt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (Gradient 5:1 → 3:1 → 1:1) aufgereinigt.

Method 2: ^{nach[325]}

Zu einer Lösung aus 151 mg 5-(4-Methoxy-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**305**) (0.47 mmol, 1.00 eq) in 0.75 mL abs. DMF werden 60 mg frisch im Vakuum entwässertes LiCl (1.41 mmol, 3.0 eq) zugegeben. Die Mischung wird für 20 min und noch einmal für 30 min bei 180 °C in die MW gegeben.

Der Reaktionsmischung wird 1 mL 1M HCL und 5 mL H₂O zugesetzt, wobei ein klebriger gelblicher Feststoff ausfällt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 7 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ca. 15 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Method 3: ^{nach[330]}

Ein Gemisch aus 250 mg 5-(4-Methoxy-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**305**) (0.78 mmol, 1.0 eq) und 1580 mg Pyridiniumhydrochlorid (13.63 mmol, 18.0 eq) wird für 90 min bei 210 °C geschmolzen.

Der Rückstand wird in 10 mL Wasser suspendiert. Der Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (Gradient 5:1 → 3:1 → 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: Method 1: 47 mg (24%)
Method 2: 47 mg (29%)
Method 3: 186 mg (80%)

Summenformel: C₁₅H₉F₃N₂O₂

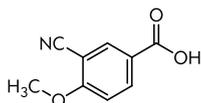
Molmasse: 306.24 g/mol

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.5 (Hex/EE 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = = 11.85 (br s, 1H, -OH), 8.30-8.26 (m, 2H, 6H-PhCF₃ + 2H-PhCF₃), 8.11-8.07 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.64-7.57 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.27 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz, 5H-PhCF₃), 4.04 (s, 3H, -OCH₃).

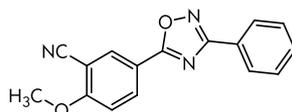
ESI-MS: m/z = 304.7 [M+H]⁺

3-Cyano-4-methoxybenzoesäure (308)^[323]

Eine Lösung aus 312 mg 3-Cyano-4-methoxybenzoesäuremethylester (**307**) (1.63 mmol, 1.0 eq) und 265 mg Lithiumhydroxid (11.10 mmol, 7.0 eq) in einer Mischung aus je 20 mL THF, MeOH und 1.5 mL Wasser werden für 16 Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Die klare Mischung wird mit 2M HCl auf pH 2 gebracht und dreimal mit je ca. 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	280 mg (quant.)
Summenformel:	C ₉ H ₇ NO ₃
Molmasse:	177.16 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.05 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 13.19 (s, 1H, -COOH), 8.21-8.19 (m, 2H, 2H,6H-PhCN), 7.36 (d, 1H, ³ J = 9.5 Hz, 5H-PhCN), 4.00 (s, 3H, -OCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 175.5 [M-H] ⁻

2-Methoxy-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril (310)Methode 1: Mikrowellensynthese nach [273]

Eine Lösung aus 280 mg 3-Cyano-4-methoxybenzoesäure (**308**) (1.58 mmol, 1.0 eq), 315 mg HOBt*H₂O (2.05 mmol, 1.3 eq), 0.40 mL EDC (2.19 mmol, 1.4 eq) in 2.5 mL abs. DMF wird bei Raumtemperatur ca. 30 min gerührt.

Dann wird eine Lösung aus 215 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (1.58 mmol, 1.0 eq) in 2 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle 30 min bei 180 °C erwärmt.

Die rot-gelbliche Mischung wird auf ca. 10 mL Eiswasser gegeben wobei ein weißlicher Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 20 min lange gerührt, abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen. Das Rohprodukt in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Das Rohprodukt wird erneut in 2.5 mL DMF gelöst und 20 min bei 180 °C in der Mikrowelle erwärmt. Die Reaktionsmischung wird wie oben aufgearbeitet.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt.

Methode 2: nach [326]

Eine Mischung aus 256 mg 5-(3-Brom-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**312**) (0.773 mmol, 1.0 eq) und 91 mg Zinkcyanid (0.77 mmol, 1.0 eq) in 7 mL abs. DMF wird unter Argon 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 45 mg Tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.038 mmol, 0.05 eq) zugegeben und die Mischung für 24 Stunden bei 80 °C erhitzt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 20 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (Gradient 98:2 → 95:5 → 9:1) und ein weiteres Mal mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und MeOH ges. mit Ammoniak (99:1) aufgereinigt.

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

Methode 3: nach [329]

Eine Lösung aus 161 mg 3-Cyano-4-methoxybenzoesäure (**308**) (0.91 mmol, 1.0 eq), 0.33 mL Thionylchlorid (4.54 mmol, 5.0 eq) in 5 mL Toluol wird für 7.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und noch einmal mit Toluol coevaporiert.

Der Rückstand wird in 5 mL einer 1:1 Mischung aus abs. Pyridin und abs. Toluol gelöst und zu einer Lösung aus 124 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (0.91 mmol, 1.0 eq) in 8 mL einer 1:1 Mischung aus abs. Pyridin und abs. Toluol gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die klargewordene Mischung für 20 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und noch dreimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird aus wenig MeOH umkristallisiert.

Ausbeute: Methode 1: 28 mg (6%)
Methode 2: 42 mg (20%)
Methode 3: 600 mg (89%)

Summenformel: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂

Molmasse: 320.27 g/mol

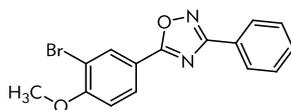
Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.23 (Hex/EE 3:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.52 (d, 1H, ⁴J = 2.1 Hz, 6H-PhCN), 8.45 (dd, 1H, ⁴J = 2.2 Hz, ³J = 8.9 Hz, 4H-PhCN), 8.11-8.07 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.65-7.60 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.53 (d, 1H, ³J = 9.0 Hz, 3H-PhCN), 4.06 (s, 3H, -OCH₃).

ESI-MS: m/z = 278.5 [M+H]⁺ und 566.1 [M+H]²⁺

5-(3-Brom-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**312**) nach[273]



Methode 1: Mikrowellensynthese nach [273]

Eine Lösung aus 255 mg 4-Methoxy-3-brombenzoesäure (**311**) (1.07 mmol, 1.0 eq), 197 mg HOBt*H₂O (1.29 mmol, 1.2 eq), 0.22 mL EDC (1.18 mmol, 1.1 eq) in 4 mL abs DMF wird bei Raumtemperatur ca. 15 min gerührt.

Dann werden 146 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (1.07 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle 2 Stunden bei 170 °C erwärmt.

Die gelbliche Mischung wird auf ca. 10 mL Eiswasser gegeben wobei ein weißlicher Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 20 min lange gerührt, abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Methode 2: nach [329]

Eine Lösung aus 510 mg 3-Cyano-4-methoxybenzoesäure (**308**) (2.14 mmol, 1.0 eq), 0.8 mL Thionylchlorid (10.71 mmol, 5.0 eq) in 5 mL Toluol wird für 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und noch einmal mit Toluol coevaporiert.

Der Rückstand wird in 5 mL einer 1:1 Mischung aus abs. Pyridin und abs. Toluol gelöst und zu einer Lösung aus 292 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (2.14 mmol, 1.0 eq) in 8 mL einer 1:1 Mischung aus abs. Pyridin und abs. Toluol gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die klargewordene Mischung für 19 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und noch dreimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird aus wenig MeOH umkristallisiert.

Ausbeute: Methode 1: 239 mg (67%)
Methode 2: 600 mg (65%)

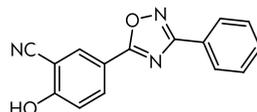
Summenformel: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂

Molmasse: 331.16 g/mol

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

<i>Aussehen:</i>	schneeweißer Feststoff
<i>R_F-Wert:</i>	0.63 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 8.33 (d, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, 2H-PhBr), 8.19 (dd, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, ³ J = 8.7 Hz, 6H-PhCF ₃), 8.12-8.08 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.62-7.59 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.38 (d, 1H, ³ J = 8.7 Hz, 5H-PhBr), 4.00 (s, 3H, -OCH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 331.1, 332.9 [M+H] ⁺

2-Hydroxy-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonnitril (317) ^{nach[330]}



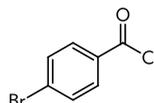
Ein Gemisch aus 60 mg 2-Methoxy-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonnitril (**310**) (0.22 mmol, 1.0 eq) und 450 mg Pyridiniumhydrochlorid (3.90 mmol, 18.0 eq) wird für zwei Stunden bei 210 °C geschmolzen.

Der Rückstand wird in 10 mL Wasser suspendiert. Der Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Das Rohprodukt wird in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

<i>Ausbeute:</i>	52 mg (91%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₅ H ₉ N ₃ O ₂
<i>Molmasse:</i>	306.24 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer Feststoff
<i>R_F-Wert:</i>	0.10 (Hex/EE 1:2)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 12.83 (br s, 1H, -OH), 8.40 (s, 1H, 6H-PhCN), 8.28 (d, 1H, ³ J = 7.3 Hz, 2H-PhCN), 8.09-8.07 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.61 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.21 (d, 1H, ³ J = 8.8 Hz, 3H-PhCN).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 262.12 [M-H] ⁻

4-Brombenzoylchlorid ^[452]

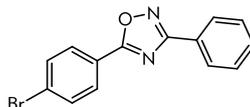


Eine Mischung aus 1.40g 4-Brombenzoesäure (7.46 mmol, 1.0 eq), 3.0 mL Thionylchlorid (41.27 mmol, 5.5 eq) und 10 mL abs. Toluol wird für 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach kurzer Zeit verfestigt sich die Mischung und wird dann grünlich und klar.

Das Lösemittel und das überschüssige Thionylchlorid werden im Vakuum entfernt. Das Säurechlorid wird ohne weitere Aufreinigung und Analytik umgesetzt.

<i>Ausbeute:</i>	1.6 g (quant. angenommen)
<i>Summenformel:</i>	C ₇ H ₄ BrClO
<i>Molmasse:</i>	219.46 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gold-gelbliches Öl

5-(4-Bromphenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (ST-1423) ^[272]



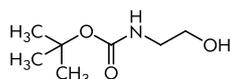
Zu einer Lösung aus 1.60 g 4-Brombenzoylchlorid (**320**) (7.29 mmol, 1.0 eq) in 6 mL abs. Pyridin werden 1.17 g (Z)-*N*'-Hydroxybenzamidin (**191**) (8.60 mmol, 1.18 eq) gegeben und die feststoffhaltige Lösung wird für 20 Stunden zum Sieden erhitzt.

8.1.1 Synthese der Oxadiazol-Grundgerüste

Der orangenen Reaktionslösung werden nach Abkühlen auf Raumtemperatur ca. 25 mL Ethanol zugesetzt, woraufhin sich ein weißer voluminöser Feststoff bildet, der abgesaugt und mit Ethanol nachgewaschen wird. Aus dem Filtrat fällt nach einiger Zeit weiteres Produkt aus.

<i>Ausbeute:</i>	1.41 g (64%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₄ H ₉ BrN ₂ O ₂
<i>Molmasse:</i>	301.14 g/mol
<i>Aussehen:</i>	feinkristalliner Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL196, ST-1423
<i>R_f-Wert:</i>	0.71 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 8.12-8.06 (m, 4H, 2H,6H-Ph + 3H,5H-Ph-Br), 7.87 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 2H,6H-Ph-Br), 7.62-7.57 (m, 3H, 3H, 4H, 5H-Ph).
<i>¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 174.6, 168.2, 132.6, 131.6, 129.7, 129.2, 127.2, 127.0, 125.9, 122.5.
<i>Schmelzpunkt:</i>	119 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 300.8. 302.8 [M+H] ⁺
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: m/z = 300.99710 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 300.99764 [M+H] ⁺ (Δ: 1.8 ppm)
<i>CHN:</i>	Ber.: C 55.84, H 3.01, N 9.30 Gef.: C 55.83, H 3.09, N 9.12

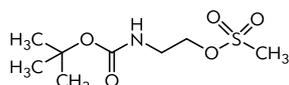
8.1.2 Synthese der Oxadiazollinkerderivate

tert-Butyl-2-hydroxyethylcarbamate (205)^[275]

Zu einer Lösung aus 2.18 mL Aminoethanol (**204**) (36.29 mmol, 1.0 eq) in 15 mL abs. Dichlormethan wird bei Raumtemperatur tropfenweise eine Lösung aus 8.00 g (36.70 mmol, 1.01 eq) di-tert-Butyldicarbonat in 25 mL abs. Dichlormethan langsam zugegeben. Die Mischung wird 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die klare Reaktionsmischung wird mit ca. 50 mL Et₂O verdünnt und zweimal mit ca. 25 mL saurem Wasser (120 mL Wasser und 1 Tropfen konz. HCl) und je einmal mit ca. 25 mL ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

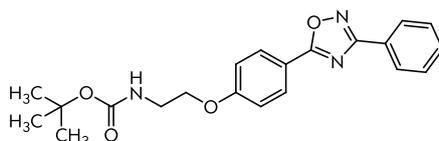
Ausbeute:	2.66 g (45%)
Summenformel:	C ₇ H ₁₅ NO ₃
Molmasse:	161.20 g/mol
Aussehen:	farbloses Öl
R _F -Wert:	0.16 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃):	δ = 5.02 (br s, 1H, NH), 3.68 (t, 2H, ³ J = 5.0 Hz, -CH ₂ -CH ₂ -OH), 3.26 (pq, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -OH), 2.71 (br s, 1H, -OH), 1.44 (s, 9H, 3x CH ₃).

2-(tert-Butoxycarbonylamino)ethylmethansulfonat (206)^[276]

Zu einer Lösung aus 300 mg (1.86 mmol, 1.0 eq) tert-Butyl-2-hydroxyethylcarbamate (**205**) und 0.3 mL (3.72 mmol, 2.0 eq) Pyridin in 4 mL abs. Dichlormethan werden bei 0 °C 0.18 mL (2.23 mmol, 1.2 eq) Methansulfonylchlorid zugegeben und die Lösung für 10 min bei 0 °C und anschließend 45 min bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionsmischung wird je dreimal mit ca. 5 mL 5% HCl und ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	422 mg (quant.)
Summenformel:	C ₈ H ₁₇ NO ₅ S
Molmasse:	239.29 g/mol
Aussehen:	farbloses Öl
R _F -Wert:	0.33 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃):	δ = 4.98 (br s, 1H, NH), 4.28 (t, 2H, ³ J = 5.1 Hz, -CH ₂ -CH ₂ -OMs), 3.47 (pq, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -OH), 3.03 (s, 3H, -O-SO ₂ -CH ₃), 1.45 (s, 9H, 3x CH ₃).

tert-Butyl 2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethylcarbamate (207)^[277]

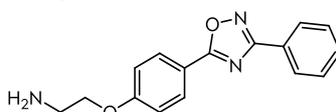
Eine Suspension aus 200 mg 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) (0.84 mmol, 1.0 eq) und 464 mg (3.36 mmol, 4.0 eq) Cs₂CO₃ in 5 mL abs. DMF wird für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 221 mg (0.92 mmol, 1.1 eq) 2-(tert-Butoxycarbonylamino)ethylmethansulfonat (**206**) zugegeben und die Lösung 14 Stunden bei 90 °C gerührt.

8.1.2 Synthese der Oxadiazollinkerderivate

Die feststoffhaltigen Reaktionsmischung wird auf 10 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein Feststoff bildet. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Ausbeute:	662 mg (83%)
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₄
Molmasse:	381.43 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.57 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.16 (d, 4H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.52-7.48 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.03 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 5.00 (br s, 1H, NH), 4.18 (t, 2H, ³ J = 5.1 Hz, -CH ₂ -CH ₂ -O-), 3.58 (pq, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -O-), 1.46 (s, 9H, 3x CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 382.3 [M+H] ⁺ , 764.0 [M+H] ²⁺

2-(4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethanamin (208)^[278]

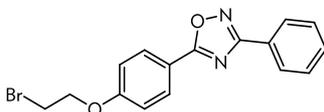


Zu einer Lösung aus 168 mg *tert*-Butyl 2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy) ethylcarbammat (**207**) (0.44 mmol, 1.0 eq) in 3mL abs. Dichlormethan werden 0.5 mL (6.5 mmol, 14.0 eq) TFA gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in ca. 15 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je ca. 10 mL mit 10%iger K₂CO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je ca. 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	124 mg (quant.)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₂
Molmasse:	281.31 g/mol
Aussehen:	farbloser Feststoff
R _F -Wert:	0.13 (DCM/MeOH 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 8.15-8.07 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.60-7.62 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.20 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 5.00 (br s, 1H, NH), 4.06 (t, 2H, ³ J = 5.6 Hz, H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -), 3.23 (br s, H ₂ N- + H ₂ O), 2.93 (t, 2H, ³ J = 5.5 Hz, H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -).
ESI-MS:	m/z = 282.0 [M+H] ⁺

5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (235)^{nach[291]}



Eine Lösung aus 300 mg 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) (1.26 mmol, 1.0 eq), 2.05 g Caesiumcarbonat (6.30 mmol, 5.0 eq) und 2.06 mL Dibrommethan (23.93 mmol, 19.0 eq) in 4 mL abs. DMF wird für 21 Stunden bei 80 °C gerührt.

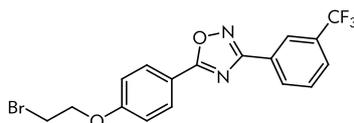
Die feststoffhaltigen Reaktionsmischung wird auf 10 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein öliger Feststoff bildet. Die Mischung wird dreimal mit je ca. 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (9:1) aufgereinigt.

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Ausbeute:	317 mg (73%)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₃ BrN ₂ O ₂
Molmasse:	345.19 g/mol
Aussehen:	weißer, kristalliner Feststoff
R _f -Wert:	0.19 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.16-8.07 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.62-7.59 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.23 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-OH), 4.47 (t, 2H, ³ J = 5.3 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph-), 3.86 (t, 2H, ³ J = 5.3 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph)
ESI-MS:	m/z = 345.1, 347.3 [M+H] ⁺

5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol (**237**)^{nach[291]}



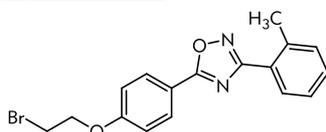
Eine Lösung aus 150 mg 4-(3-(3-(Trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**199**) (0.49 mmol, 1.0 eq), 798 mg Caesiumcarbonat (2.45 mmol, 5.0 eq) und 0.75 mL Dibromethan (8.82 mmol, 18.0 eq) in 4 mL abs. DMF wird für 48 Stunden bei 80 °C gerührt.

Die feststoffhaltigen Reaktionsmischung wird auf 10 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein öliger Feststoff bildet. Die Mischung wird dreimal mit je ca. 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ca. 50 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (5:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	153 mg (76%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₂ BrF ₃ N ₂ O ₂
Molmasse:	413.19 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.29 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.45 (s, 1H, 1H-PhCF ₃), 8.35 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 4H-PhCF ₃), 8.18 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.78 (d, 1H, ³ J = 7.9 Hz, 2H-PhCF ₃), 7.64 (t, 1H, ³ J = 7.7 Hz, 3H-PhCF ₃), 7.07 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 4.40 (t, 2H, ³ J = 6.2 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph-), 3.69 (t, 2H, ³ J = 6.2 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph).
ESI-MS:	m/z = 412.9.7, 414.2 [M+H] ⁺

5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-3-o-tolyl-1,2,4-oxadiazol (**239**)^{nach[291]}



Eine Lösung aus 150 mg 4-(3-o-Tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**203**) (0.59 mmol, 1.0 eq), 969 mg Caesiumcarbonat (2.97 mmol, 5.0 eq) und 0.92 mL Dibromethan (10.7 mmol, 18.0 eq) in 4 mL abs. DMF wird für 20 Stunden bei 80 °C gerührt.

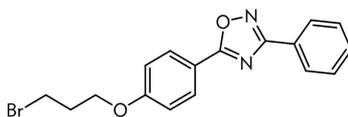
Die feststoffhaltigen Reaktionsmischung wird auf 10 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein Feststoff bildet. Der entstanden Feststoff wird abgesaugt und säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (9:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	128 mg (60%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₅ BrN ₂ O ₂
Molmasse:	359.22 g/mol

8.1.2 Synthese der Oxadiazollinkerderivate

Aussehen:	weißer Feststoff
R_f -Wert:	0.18 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 8.18$ (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 2H,6H-Ph-O-), 8.09-8.05 (m, 1H, 5H-Tolyl), 7.43-7.34 (m, 3H, 2H,3H,4H-Tolyl), 7.07 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 4.39 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, Br- CH_2 - CH_2 -O-Ph-), 3.69 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, Br- CH_2 - CH_2 -O-Ph-).
ESI-MS:	$m/z = 359.3, 361.2$ [M+H] ⁺

5-(4-(2-Brompropoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (241) ^{nach[291]}



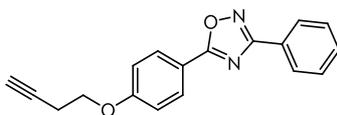
Eine Lösung aus 308 mg 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) (1.29 mmol, 1.0 eq), 2.11 g Caesiumcarbonat (6.46 mmol, 5.0 eq) und 2.5 mL Dibrompropan (24.60 mmol, 19.0 eq) in 4 mL abs. DMF wird für 21 Stunden bei 80 °C gerührt.

Die feststoffhaltige Reaktionsmischung wird auf 10 mL Wasser gegeben und dreimal mit je ca. 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wird in Hexan suspendiert und abgesaugt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (9:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	263 mg (57%)
Summenformel:	$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BrN}_2\text{O}_2$
Molmasse:	359.22 g/mol
Aussehen:	weißer, kristalliner Feststoff
R_f -Wert:	0.65 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):	$\delta = 8.19$ -8.15 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.53-7.50 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.05 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 4.21 (t, 2H, $^3J = 5.8$ Hz, Br- CH_2 - CH_2 - CH_2 -O-Ph-), 3.63 (t, 2H, $^3J = 6.3$ Hz, Br- CH_2 - CH_2 - CH_2 -O-Ph-), 2.37 (qui, 2H, $^3J = 6.0$ Hz, Br- CH_2 - CH_2 - CH_2 -O-Ph-).
ESI-MS:	$m/z = 359.1, 361.2$ [M+H] ⁺

5-(4-(But-3-ynoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (246)



Eine Lösung aus 135 mg 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) (0.57 mmol, 1.0 eq), 261 mg Kaliumcarbonat (1.13 mmol, 2.0 eq) und 0.16 mL 4-Brombutyn (**248**) (1.7 mmol, 3.0 eq) in 2 mL abs. Aceton wird für 40 min in der Mikrowelle auf 130 °C erhitzt.

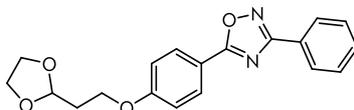
Die feststoffhaltige Reaktionsmischung wird filtriert und mit Aceton nachgewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (9:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	33 mg (20%) und 108 mg 195 (80%)
Summenformel:	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$
Molmasse:	290.32 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R_f -Wert:	0.66 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):	$\delta = 8.21$ -8.13 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.68-7.65 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.27 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 4.26 (t, 2H, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$ - CH_2 -O-Ph-), 2.97 (t, 1H, $^4J = 2.4$

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Hz, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ph}-$), 2.75 (dt, 2H, $^4J = 2.4$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ph}-$).

5-(4-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (250)^[300]

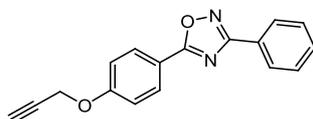


Eine Lösung aus 252 mg 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) (1.05 mmol, 1.0 eq) und 585 mg Kaliumcarbonat (4.23 mmol, 4.0 eq) in 8 mL abs. Aceton wird für 24 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach einer Stunde wird eine Lösung aus 395 mg 2-(2-Bromethyl)-1,3-dioxolan (**249**) (1.90 mmol, 1.8 eq) in 2 mL abs. Aceton zugegeben.

Die feststoffhaltige Reaktionsmischung wird filtriert, mit Aceton nachgewaschen und das Lösungsmittel des Filtrats wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	316 mg (88%)
Summenformel:	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$
Molmasse:	338.36 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R_f -Wert:	0.60 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):	$\delta = 8.18-8.14$ (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.52-7.49 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.04 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 5.12 (t, 1H, $^3J = 4.7$ Hz, -CH- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ph}-$), 4.22 (t, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, -CH- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ph}-$), 4.03-3.87 (m, 4H, -O- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$), 2.25-2.17 (m, 2H, -CH- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ph}-$).
ESI-MS:	$m/z = 339.0$ [M+H] ⁺

3-Phenyl-5-(4-(prop-2-ynoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol (254)^[454]

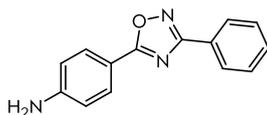


Zu einer Suspension aus 200 mg 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) (0.84 mmol, 1.0 eq), 550 mg Caesiumcarbonat (1.70 mmol, 2.00 eq) in 3 mL abs. DMF wird 1 mL einer 80%igen Propargylbromid-Lösung (**253**) in Toluol (8.9 mmol, 10.7 eq) gegeben. Die Mischung wird für 4 Stunden bei 80 °C gerührt. Die klare braune Reaktionsmischung wird auf 10 mL Eis-Wasser gegeben und dreimal mit je ca. 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ca. 50 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	235 mg (quant.)
Summenformel:	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$
Molmasse:	276.29 g/mol
Aussehen:	brauner Feststoff
R_f -Wert:	0.47 (Hex/EE 2:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 8.21-8.17$ (m, 4H, 2H,6H-Ph + 2H,6H-Ph-O-), 7.53-7.50 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.13 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 4.79 (d, 2H, $^4J = 2.3$ Hz, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}$), 2.58 (t, 1H, $^4J = 2.3$ Hz, $\text{HC}\equiv\text{C}-$).
ESI-MS:	$m/z = 277.0$ [M+H] ⁺

8.1.2 Synthese der Oxadiazollinkerderivate

4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)anilin (275)^[278]



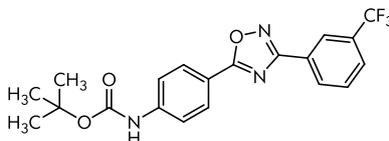
Zu einer Lösung aus 529 g *tert*-Butyl-4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenylcarbammat (**274**) (1.57 mmol, 1.0 eq) in 20 mL abs. Dichlormethan werden 2.4 mL Trifluoressigsäure (31.34 mmol, 20 eq) gegeben und die Mischung wird drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je ca. 50 mL 10%iger K₂CO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	250 mg (67%)
Summenformel:	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O
Molmasse:	237.27 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.45 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 8.06-8.04 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.84 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-Anilin), 7.61-7.57 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 6.71 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 3H,5H-Anilin), 6.19, (br s, 2H, -NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 237.9 [M+H] ⁺

tert-Butyl-4-(3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenylcarbammat (277) nach ^[273]



Eine Lösung aus 291 g 4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)benzoesäure (**273**) (1.23 mmol, 1.0 eq), 188 mg HOBT*H₂O (1.23 mmol, 1.0 eq), 235 mg EDC*HCl (1.23 mmol, 1.0 eq) in 1.5 mL abs. DMF wird bei Raumtemperatur ca. eine Stunde gerührt.

Dann wird eine Lösung aus 250 mg (*Z*)-*N'*-Hydroxy-3-(trifluormethyl)benzamidin (**197**) (1.23 mmol, 1.0 eq) in 1.5 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle zweimal für je 15 min auf 150 °C erhitzt.

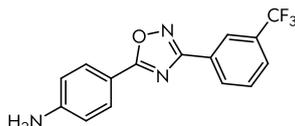
Die Mischung wird auf ca. 20 mL Eiswasser gegeben wobei ein beiger Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 30 min lange gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	140 mg (28%)
Summenformel:	C ₂₀ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃
Molmasse:	405.37 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.74 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 9.93 (s, 1H, -NH-), 8.37 (d, 1H, ³ J = 7.9 Hz, 4H-PhCF ₃), 8.32 (s, 1H, 1H-PhCF ₃), 8.12 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph-NH-), 8.01 (d, 1H, ³ J = 8.9 Hz, 2H-PhCF ₃), 7.86 (t, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 3H-PhCF ₃), 7.73 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-NH-), 1.51 (s, 9H, 3x -CH ₃).

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

4-(3-(3-(Trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)anilin (278)^[278]

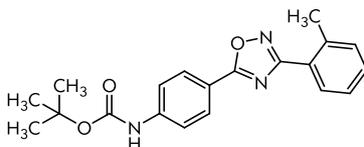


Zu einer Lösung aus 140 g *tert*-Butyl-4-(3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenylcarbammat (**277**) (0.35 mmol, 1.0 eq) in 6 mL abs. Dichlormethan werden 0.4 mL Trifluoressigsäure (5.18 mmol, 15 eq) gegeben und die Mischung wird 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je ca. 50 mL 10%iger K₂CO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	105 mg (quant.)
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₀ F ₃ N ₃ O
Molmasse:	305.26 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.48 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.35 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 4H-PhCF ₃), 8.29 (s, 1H, 1H-PhCF ₃), 7.99 (d, 2H, ³ J = 7.9 Hz, 2H-PhCF ₃), 7.88-7.81 (m, 3H, 2H,6H-Ph-NH- + 3H-PhCF ₃), 6.72 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-NH-), 6.24 (s, 2H, -NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 306.0 [M+H] ⁺

tert-Butyl-4-(3-o-tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenylcarbammat (280) nach [273]



Eine Lösung aus 150 g 4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)benzoesäure (**273**) (1.0 mmol, 1.0 eq), 153 mg HOBT·H₂O (1.0 mmol, 1.0 eq), 192 mg EDC·HCl (1.0 mmol, 1.0 eq) in 1.5 mL abs. DMF wird bei Raumtemperatur ca. eine Stunde gerührt.

Dann wird eine Lösung aus 237 mg (*Z*)-*N'*-Hydroxy-2-methylbenzamidin (**201**) (1.0 mmol, 1.0 eq) in 1.5 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle zweimal für je 15 min auf 150 °C erhitzt.

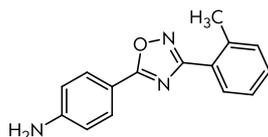
Die Mischung wird auf ca. 20 mL Eiswasser gegeben wobei ein beiger Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 30 min lange gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	135 mg (38%)
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₃
Molmasse:	351.40 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.68 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.91 (s, 1H, -NH-), 8.08 (d, 1H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph-NH-), 7.99 (d, 1H, ³ J = 7.6 Hz, 6H-Tolyl), 7.73 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-NH-), 7.52-7.27 (m, 3H,4H, 5H -Tolyl), 2.60 (s, 3H, -CH ₃), 1.51 (s, 9H, 3x -CH ₃).

8.1.2 Synthese der Oxadiazollinkerderivate

4-(3-o-Tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)anilin (**281**)^[278]

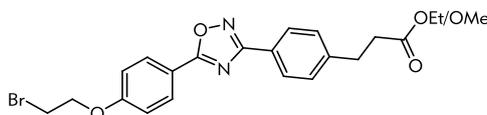


Zu einer Lösung aus 135 g *tert*-Butyl-4-(3-*o*-tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenylcarbammat (**280**) (0.38 mmol, 1.0 eq) in 6 mL abs. Dichlormethan werden 0.44 mL Trifluoressigsäure (5.76 mmol, 15 eq) gegeben und die Mischung wird 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je ca. 50 mL 10%iger K₂CO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	96 mg (quant.)
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O
Molmasse:	251.28 g/mol
Aussehen:	ockerfarbener Feststoff
R _f -Wert:	0.44 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 7.96 (d, 1H, ³ J = 6.7 Hz, 6 <i>H</i> -Tolyl), 7.83 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -Anilin), 7.50-7.35 (m, 3H, 4 <i>H</i> , 5 <i>H</i> -Tolyl), 6.71 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3 <i>H</i> , 5 <i>H</i> -Anilin) 6.17 (s, 2H, -NH ₂), 2.58 (s, 3H, -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 251.9 [M+H] ⁺

3-(4-(5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethyl und Ethylester (**293** und **294**)^{nach[291]}



Methode 1: Gemisch aus **293** und **294**

Eine Suspension aus 205 mg eines 0.18:1 Gemisches aus 3-(4-(5-(4-Hydroxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethyl und Ethylester (**291** und **292**) (0.67 mmol, 1.0 eq), 1.0 g Caesiumcarbonat (3.07 mmol, 4.6 eq) und 1.0 mL Dibromethan (11.6 mmol, 17.0 eq) in 8 mL abs. DMF wird für 16 Stunden bei 80 °C gerührt.

Die feststoffhaltigen Reaktionsmischung wird auf 25 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein ockerfarbener Feststoff bildet. Die Mischung wird ca. 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (5:1) aufgereinigt. Eine komplette Abtrennung des Ethylester (**294**) ist nicht möglich.

Ausbeute:	168 mg (74%)
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₁ BrN ₂ O ₄ bzw. C ₁₉ H ₂₀ BrN ₂ O ₄
Molmasse:	445.31 g/mol bzw. 431.28 g/mol
Aussehen:	weißlicher Feststoff
R _f -Wert:	0.56 bzw. 0.45 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 8.17 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3 <i>H</i> , 5 <i>H</i> -Ph-(CH ₂) ₂ COO-Me/Et), 8.08 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -Ph-O-), 7.34 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -Ph-OH), 7.05 (2H, ³ J = 8.7 Hz, 2 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -Ph-(CH ₂) ₂ COOMe/Et), 4.39 (t, 2H, ³ J = 6.2 Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Br), 4.13 (q, 2H, ³ J = 7.1 Hz, -COOCH ₂ CH ₃), 3.71-3.66 (m, 5H, -COOCH ₃ + O-CH ₂ -CH ₂ -Br), 3.03 (t, 2H, ³ J = 7.7 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.67 (t, 2H, ³ J = 7.7 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 1.25 (t, 3H, ³ J = 7.1 Hz, -CH ₂ -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 431.4, 433.6 [M+H] ⁺ bzw. 445.5, 447.3 [M+H] ⁺

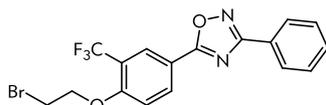
Methode 2: 293

Eine Suspension aus 700 mg 3-(4-(5-(4-Hydroxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethylester (**292**) (2.16 mmol, 1.0 eq), 3.52 g Caesiumcarbonat (10.80 mmol, 5.0 eq) und 3.5 mL Dibromethan (40.62 mmol, 18.8 eq) in 20 mL abs. DMF wird für 24 Stunden bei 80 °C gerührt.

Die feststoffhaltigen Reaktionsmischung wird auf 55 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein weißer Feststoff bildet. Die Mischung wird ca. 45 min. bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen.

Das Rohprodukt wird in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Ausbeute:	819 mg (88%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₂₀ BrN ₂ O ₄
Molmasse:	431.28 g/mol
Aussehen:	weißlicher Feststoff
R _F -Wert:	0.45 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.13 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-Ph-(CH ₂) ₂ COOMe), 7.99 (d, 2H, ³ J = 7.9 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.45 (d, 2H, ³ J = 7.9 Hz, 2H,6H-Ph-OH), 7.23 (2H, ³ J = 8.5 Hz, 2H,6H-Ph-(CH ₂) ₂ COOMe), 4.47 (t, 2H, ³ J = 4.9 Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Br), 3.68 (t, 2H, ³ J = 4.9 Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Br), 3.59 (s, 3H, -OCH ₃), 2.95 (t, 2H, ³ J = 7.2 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.70 (t, 2H, ³ J = 7.2 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -).

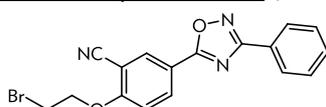
5-(4-(2-Bromethoxy)-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (314) nach^[291]

Eine Suspension aus 0.20 g 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-2-(trifluormethyl)phenol (**306**) (0.65 mmol, 1.0 eq), 1.06 g Caesiumcarbonat (3.27 mmol, 5.0 eq), 1.2 mL Dibromethan (13.9 mmol, 21 eq) in 5 mL abs. DMF wird für 24 Stunden bei 80 °C gerührt.

Nach abkühlen auf Raumtemperatur wird die weißliche Reaktionssuspension auf 15 mL Wasser gegeben und dreimal mit je ca. 50 mL Ethylacetat extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wird aus MeOH umkristallisiert.

Ausbeute:	207 mg (77%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₂ BrF ₃ N ₂ O ₂
Molmasse:	413.19 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.6 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.43 (dd, 1H, ³ J = 8.8 Hz, ⁴ J = 2.1 Hz, 6H-PhCF ₃), 8.34 (d, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, 2H-PhCF ₃), 8.13-8.09 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.64-7.55 (m, 4H, 3H,4H,5H-Ph + 5H-PhCF ₃), 4.64 (t, 2H, ³ J = 5.2 Hz, Br-CH ₂ CH ₂ -O), 3.87 (t, 2H, ³ J = 5.2 Hz, Br-CH ₂ CH ₂ -O).
ESI-MS:	m/z = 413.54, 414.89 [M+H] ⁺

2-(2-Bromethoxy)-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril (318) nach^[291]

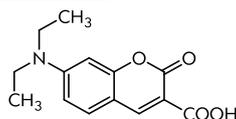
Eine Suspension aus 143 mg 2-Hydroxy-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril (**317**) (0.54 mmol, 1.0 eq), 885 g Caesiumcarbonat (2.27 mmol, 5.0 eq), 0.9 mL Dibromethan (10.4 mmol, 19.2 eq) in 5 mL abs. DMF wird für 24 Stunden bei 80 °C gerührt.

8.1.2 Synthese der Oxadiazollinkerderivate

Nach abkühlen auf Raumtemperatur wird die bräunliche Reaktionssuspension auf 15 mL Wasser gegeben. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt.

<i>Ausbeute:</i>	81 mg (40%)
<i>Summenformel:</i>	$C_{17}H_{12}BrN_3O_2$
<i>Molmasse:</i>	370.20 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer Feststoff
<i>R_f-Wert:</i>	0.55 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-<i>d</i>₆):</i>	$\delta = 8.55$ (d, 1H, $^4J = 2.1$ Hz, 6H-PhCN), 8.44 (dd, 1H, $^4J = 2.3$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, 3H-PhCN), 8.12-8.08 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.65-7.59 (m, 4H, 3H,4H,5H-Ph) 7.56 (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, 3H-PhCN), 4.67-4.64 (m, 2H, Br-CH ₂ CH ₂ -O), 3.82-3.89 (m, 2H, Br-CH ₂ CH ₂ -O).
<i>ESI-MS:</i>	$m/z = 370.31, 371.24 [M+H]^+$

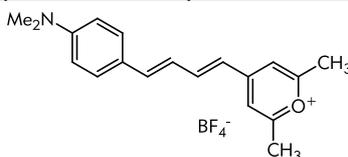
8.1.3 Synthese der Fluorophore / Fluorophorvorstufen

7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (213)^{[280] besser[281]}

Eine Suspension aus 1.0 g 4-(Diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyd (**211**) (5.18 mmol, 1.0 eq), 0.75 g Meldrumssäure (**212**) (5.18 mmol, 1.0 eq), 0.04 g Piperidin (0.52 mmol, 0.1 eq) und zwei Tropfen Eisessig in 8 mL EtOH wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für drei Stunden zum Sieden erhitzt.

Die Hälfte des Lösungsmittels wird im Vakuum entfernt und der Mischung wird auf ca. 15 mL Eiswasser gegeben. Der entstandene Feststoff wird abgenutscht und mit EtOH nachgewaschen.

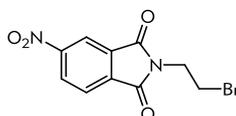
Ausbeute:	854 mg (63%)
Summenformel:	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄
Molmasse:	261.27 g/mol
Aussehen:	orangener, kristalliner Feststoff
R _f -Wert:	0.01 (Hex:EE 1:1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 12.50 (br s, 1H, -COOH), 8.58 (s, 1H, CH=C), 7.63 (d, 1H, ³ J = 9.0 Hz, 5H-Ph), 6.79 (d, 1H, ³ J = 9.0 Hz, 6H-Ph), 6.57 (s, 1H, 8H-Ph), 3.48 (q, 4H, ³ J = 7.0 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂), 1.14 (t, 6H, ³ J = 6.9 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂)
ESI-MS:	m/z = 260.0 [M-H] ⁻

4-((1E,3E)-4-(4-(Dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dienyl)-2,6-dimethylpyrylium Tetrafluorborat (216)^[270,285]

Eine Lösung aus 200 mg E-Dimethylaminozimtaldehyd (**214**) (1.14 mmol, 1.0 eq) und 239 mg (1.14 mmol, 1.0 eq) 2,4,6-Trimethylpyrylium Tetrafluorborat (**215**) in 40 mL abs. MeOH wird bei Raumtemperatur 17 Stunden gerührt.

Das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Ausbeute:	415 mg (quant.)
Summenformel:	C ₁₉ H ₂₂ NO + BF ₄
Molmasse:	280.38 g/mol + 87.00 g/mol
Aussehen:	grünlich schwarzer Feststoff
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.28-8.18 (m, 1H, -CH=CH-CH=CH- Pyrylium), 7.02 (2, 2H, Pyrylium), 7.63 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph), 7.10-7.24 (m, 2H, -CH=CH-CH=CH- Pyrylium), 6.80 (d, 2H, ³ J = 9.0 Hz, 3H,5H-Ph), 6.61 (d, 1H, ³ J = 14.6 Hz, -CH=CH-CH=CH- Pyrylium), 3.08 (s, 6H, N-(CH ₃) ₂), 2.63 (s, 6H, 2 x Pyridinium-CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 280.2 [M+H] ⁺

N-(2-Bromethyl)-4-Nitrophthalimid (225)^[288]

Bei 0 °C werden zu 10 mL konzentrierte Schwefelsäure (0.18 mol) langsam 2.5 mL 65%ige Salpetersäure (0.036 mol) gegeben. Dann werden bei Raumtemperatur portionsweise über 20 min 2.00 g N-(2-

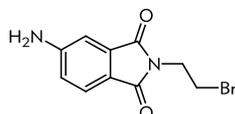
8.1.3 Synthese der Fluorophore / Fluorophorvorstufen

Bromethyl)phthalimid (**224**) (7.87 mmol) Phthalimide zugegeben. Die gelbliche Reaktionsmischung wird dann langsam auf 60 °C erwärmt und für 40 min gerührt.

Die Reaktionsmischung wird auf 0 °C gekühlt und langsam auf Eis gegeben, dabei wird darauf geachtet, dass die Mischung nicht wärmer als 10 °C wird. Der weißliche Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute:	2.29 mg (97%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₇ BrN ₂ O ₄
Molmasse:	299.08 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.30 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.65 (d, 1H, ³ J = 8.0 Hz, 5H-Pht), 8.54 (s, 1H, 3H-Pht), 8.17 (d, 1H, ³ J = 8.1 Hz, 6H-Pht), 4.04 (t, 2H, ³ J = 6.1 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -), 3.72 (t, 2H, ³ J = 6.1 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -).
ESI-MS:	m/z = 297.8, 299.8 [M-H] ⁻

N-(2-Bromethyl)-4-aminophthalimid (**226**)^[288]

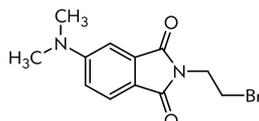


Zu einer Lösung aus 5.91 g Zinnchlorid (31.2 mmol, 4.2 eq) in 33 mL rauchender Salzsäure und 10 mL Wasser werden langsam, portionsweise 2.22 g (7.42 mmol, 1.0 eq) N-(2-Bromomethyl)-4-Nitrophthalimid (**225**) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1.5 Stunden bei 50 °C gerührt.

Die Reaktionsmischung wird mit 5 M NaOH neutralisiert und neun Mal mit je ca. 200 mL Ethylacetat extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernen. Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute:	1.41 mg (97%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₉ BrN ₂ O ₂
Molmasse:	269.10 g/mol
Aussehen:	hellgelber Feststoff
R _f -Wert:	0.30 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 7.50 (d, 1H, ³ J = 8.2 Hz, 6H-Pht), 6.93 (d, 1H, ⁴ J = 1.9 Hz, 3H-Pht), 6.80 (dd, 1H, ³ J = 8.2 Hz, ⁴ J = 2.0 Hz, 6H-Pht), 6.51 (s, 2H, -NH ₂), 3.89 (t, 2H, ³ J = 6.4 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -), 3.67 (t, 2H, ³ J = 6.4 Hz, Br-CH ₂ -CH ₂ -).
ESI-MS:	m/z = 266.7, 269.0 [M-H] ⁻

N-(2-Bromomethyl)-4-Dimethylaminophthalimid (**227**)^{nach[267,289]}



Zu 500 mg 4- N-(2-Bromomethyl)-4-aminophthalimid (**226**) (1.86 mmol, 1.0 eq) werden 0.88 mL (9.29 mmol, 5 eq) Dimethylsulfat gegeben. Der feuchte Feststoff wird für 1 Stunde im 150 °C heißem Ölbad erhitzt. Die Mischung wird dabei langsam flüssiger und rot.

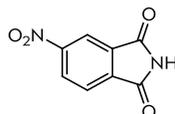
Zu der noch heißen Mischung werden ca. 75 mL Wasser gegeben, wobei sich ein Feststoff bildet. Die Mischung wird ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und das Filtrat wird dreimal mit je ca. 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das so erhaltene Rohprodukt (Filterkuchen und Extrakt) wird durch Säulenchromatographie mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (2:1) aufgereinigt.

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Ausbeute:	232 mg (42%)
Summenformel:	C ₁₂ H ₁₃ BrN ₂ O ₂
Molmasse:	297.15 g/mol
Aussehen:	sonnengelber Feststoff
R _F -Wert:	0.47 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.63 (d, 1H, ³ J = 8.5 Hz, 6H-Pht), 7.05 (s, 1H, 3H-Pht), 6.94 (d, 1H, ³ J = 8.4 Hz, 5H-Pht), 3.93 (t, 2H, ³ J = 6.1 Hz, Br-CH ₂ CH ₂ -), 3.69 (t, 2H, ³ J = 6.1 Hz, Br-CH ₂ CH ₂ -), 3.09 (s, 6H, 2x CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 296.8, 298.9 [M+H] ⁺

4-Nitrophthalimid (230)^[288]



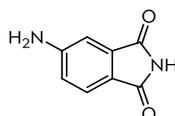
Bei 0 °C werden zu 10 mL konzentrierte Schwefelsäure (0.18 mol) langsam 2.5 mL 65%ige Salpetersäure (0.036 mol) gegeben. Dann werden bei Raumtemperatur portionsweise über 20 min 2.00 g Phthalimide (**229**) (13.6 mmol) zugegeben. Die gelbliche Reaktionsmischung wird dann langsam auf 50 °C erwärmt und für 40 min gerührt.

Die Reaktionsmischung wird auf 0 °C gekühlt und langsam auf Eis gegeben, dabei wird darauf geachtet, dass die Mischung nicht wärmer als 10 °C wird. Der weißliche entstehende Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Das Rohprodukt kann aus EtOH umkristallisiert werden.

Ausbeute:	1.69 g (65%)
Summenformel:	C ₈ H ₄ N ₂ O ₄
Molmasse:	192.13 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.49 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 11.84 (br s, 1H, NH), 8.61 (dd, 1H, ³ J = 8.2 Hz, ⁴ J = 2.0 Hz, 5H-Pht), 8.44 (d, 1H, ⁴ J = 1.7 Hz, 3H-Pht), 8.07 (d, 1H, ³ J = 8.2 Hz, 6H-Pht).
ESI-MS:	m/z = 190.7 [M-H] ⁻

4-Aminophthalimid (231)^[288]



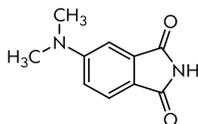
Zu einer Lösung aus 5.30 g Zinnchlorid (28 mmol, 4.2 eq) in 27 mL rauchender HCl und 9 mL Wasser werden langsam, portionsweise 1.28 g 4-Nitrophthalimid (**230**) (6.65 mmol, 1.0 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1.5 Stunden bei 50 °C gerührt.

Die weiße feststoffhaltige Reaktionsmischung wird auf 0 °C gekühlt und der Feststoff wird abgesaugt. Der weiße Rückstand wird mit ca. 50 mL heißen Wasser gewaschen, woraufhin er sich sonnengelb verfärbt.

Ausbeute:	0.99 g (91%)
Summenformel:	C ₈ H ₆ N ₂ O ₂
Molmasse:	162.15 g/mol
Aussehen:	sonnengelber Feststoff
R _F -Wert:	0.21 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.72 (br s, 1H, NH), 7.42 (d, 1H, ³ J = 8.2 Hz, 6H-Pht), 6.85 (d, 1H, ⁴ J = 1.7 Hz, 3H-Pht), 6.78 (dd, 1H, ³ J = 8.2 Hz, ⁴ J = 1.9 Hz, 5H-Pht), 6.40 (br s, 2H, NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 160.5 [M-H] ⁻ , 196.6 [M-H+Cl] ⁻ , 358.8 [M-H+Cl] ²⁻

8.1.3 Synthese der Fluorophore / Fluorophorvorstufen

4-Dimethylaminophthalimid (**232**) nach^[267,289]



Zu 1.86 g 4-Aminophthalimid (**231**) (11.50 mmol, 1.0 eq) werden 5.50 mL (57.99 mmol, 5 eq) Dimethylsulfat gegeben. Der feuchte Feststoff wird für 2 Stunde im 130 °C heißem Ölbad erhitzt. Die Mischung wird dabei langsam flüssiger und rot.

Zu der noch heißen Mischung werden ca. 50 mL Wasser gegeben, wobei sich ein Feststoff bildet. Die Mischung wird ca. 1.5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und der entstandene Feststoff wird abgesaugt und lyophilisiert.

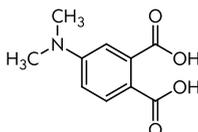
Das Filtrat wird mit 1M NaOH auf pH 4-5 gebracht und über Nacht stehen gelassen. Der sich dabei abscheidende Feststoff wird abgesaugt und lyophilisiert.

Das Filtrat wird dreimal mit je ca. 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das so erhaltene Rohprodukt (Filterkuchen und Extrakt) wird durch wiederholte, kurze Säulenchromatographie mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und mit Ammoniak gesättigtem Methanol (95:5) aufgereinigt.

Ausbeute:	0.89 g (41%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂
Molmasse:	190.20 g/mol
Aussehen:	fluoreszierend gelber Feststoff
R _F -Wert:	0.47 (DCM/MeOH ges. NH ₃ 95:5)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.65 (d, 1H, ³ J = 8.6 Hz, 6H-Pht), 7.47 (br s, 1H, NH), 7.05 (d, 1H, ³ J = 2.4 Hz, 3H-Pht), 6.83 (dd, 1H, ³ J = 8.6 Hz, ⁴ J = 2.4 Hz, 5H-Pht), 3.12 (s, 6H, 2x CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 190.7 [M+H] ⁺ , 380.7 [M+H] ²⁺

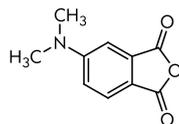
4-Dimethylaminophthalsäure (**261**)^[303]



Eine Mischung aus 50 mg 4-Dimethylaminophthalimid (**232**) (0.35 mmol, 1.0 eq) und 0.75 mL 1.5M NaOH (1.13 mmol, 3.2 eq) wird für 15 min in der Mikrowelle auf 160 °C erhitzt.

Die farblose Mischung wird mit 1M HCl auf pH 4 gebracht, wobei sich ein Feststoff bildet, der abgesaugt mit Wasser nachgewaschen wird. Das Filtrat wird fünfmal mit je ca. 50 mL THF Toluol (1:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Filterkuchen und das Extrakt werden vereinigt.

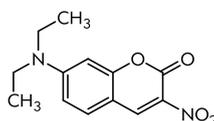
Ausbeute:	39 g (71%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄
Molmasse:	209.20 g/mol
Aussehen:	farbloser, teils kristalliner Feststoff
R _F -Wert:	0.07 (Hex/EE 1:1 + HOAc)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 12.62 (br s, 2H, 2x COOH); 7.66 (d, 1H, ³ J = 8.8 Hz, 6H-Pht), 6.63 (dd, 1H, ³ J = 8.9 Hz, ⁴ J = 2.6 Hz, 5H-Pht), 6.64 (d, 1H, ³ J = 2.5 Hz, 3H-Pht), 2.99 (s, 6H, 2x CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 207.6 [M-H] ⁻

4-Dimethylaminophthalsäureanhydrid (262)^[303]

Eine Suspension aus 50 mg 4-Dimethylaminophthalsäure (**261**) (0.11 mmol, 1.0 eq) in 0.2 mL Essigsäureanhydrid (2.12 mmol, 19 eq) wird für 15 min in der Mikrowelle auf 160 °C erhitzt.

Das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

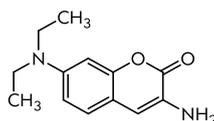
<i>Ausbeute:</i>	20 mg (96%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₀ H ₉ NO ₃
<i>Molmasse:</i>	191.18 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelblicher Feststoff
<i>R_f-Wert:</i>	0.61 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-<i>d</i>₆):</i>	δ = 7.79 (d, 1H, ³ J = 8.6 Hz, 6H-Pht), 7.14-7.10 (m, 2H, 3H,5H-Pht), 3.13 (s, 6H, 2x CH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 191.7 [M-H] ⁻

7-(Diethylamino)-3-nitro-chromen-2-on (243)^[296]

Eine Mischung aus 1.7 g 4-Diethylamino-2-hydroxybenzaldehyd (**211**) (9.04 mmol, 1.0 eq), 1.0 mL 2-Nitroethylacetat (9.04 mmol, 1.0 eq), 0.05 mL Piperidin (0.51 mmol, 0.06 eq) in 40 ml Toluol wird unter Feuchtigkeitsausschluss für 24 Stunden am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt.

Nach Abkühlen der Reaktionslösung wird der entstandene Feststoff abgesaugt und mit Toluol nachgewaschen.

<i>Ausbeute:</i>	2.28 mg (96%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₄
<i>Molmasse:</i>	262.26 g/mol
<i>Aussehen:</i>	orangener Feststoff
<i>R_f-Wert:</i>	0.20 (Hex:EE 2:1)
<i>¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆):</i>	δ = 9.03 (s, 1H, CH=C), 7.73 (d, 1H, ³ J = 9.0 Hz, 5H-Chromen), 6.91 (d, 1H, ⁴ J = 2.3 Hz, ³ J = 9.0 Hz, 6H-Chromen), 6.64 (s, 1H, ⁴ J = 1.8 Hz, 8H-Chromen), 3.54 (q, 4H, ³ J = 7.3 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂), 1.16 (t, 6H, ³ J = 7.0 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂)
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 263.0 [M-H] ⁺

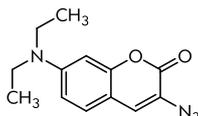
3-Amino-7-(diethylamino)-chromen-2-on (244)^[294]

Zu 5 mL konz. HCl werden 1.30 g Zinnchlorid (6.86 mmol, 7.2 eq) gegeben. Bei Raumtemperatur werden 250 mg 7-(Diethylamino)-3-nitro-2H-chromen-2-on (**243**) (0.95 mmol, 1.0 eq) über 20 min portionsweise zugegeben. Die klare, orangene Lösung wird für 4,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf 40 g Eis gegeben und mit 5M Natronlauge auf pH 8-9 gebracht, wobei sie sich milchig gelblich trübt. Die entstandene Suspension wird viermal mit je ca. 100 mL Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ca. 50 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

8.1.3 Synthese der Fluorophore / Fluorophorvorstufen

Ausbeute:	397 mg (90%)
Summenformel:	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂
Molmasse:	232.28 g/mol
Aussehen:	hellgelber Feststoff
R _f -Wert:	0.57 (Hex:EE 1:4)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.11 (d, 1H, ³ J = 8.6 Hz, 5H-Chromen), 6.70 (s, 1H, CH=C), 6.59-6.52 (m, 2H, 6H-Chromen + 8H-Chromen), 3.86 (br s, 2H, -NH ₂), 3.37 (q, 4H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂), 1.18 (t, 6H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂)
ESI-MS:	m/z = 233.0 [M-H] ⁺

3-Azido-7-(diethylamino)-chromen-2-on (245)^[294]

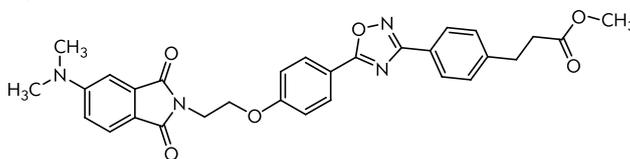


Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 396 mg 3-Amino-7-(diethylamino)- 2H-chromen-2-on (**244**) (1.71 mmol, 1.0 eq) in 15.8 mL 5.2 molarer HCl werden 118 mg Natriumnitrit (1.71 mmol, 1.0 eq) gegeben. Die orangene Reaktionsmischung wird für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Der pH der Lösung wird mit ca. 4.9 M Natriumacetat-Lösung auf 4 eingestellt. Dann werden 227 mg Natriumazid (3.49 mmol, 2.05 eq) portionsweise zugegeben und die Lösung für 5 Stunden bei 0 °C gerührt.

Der entstandene gelbe Feststoff wird abgenutscht und mit Eiswasser nachgewaschen.

Ausbeute:	430 mg (quant.)
Summenformel:	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O ₂
Molmasse:	258.28 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
R _f -Wert:	0.74 (Hex:EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.18 (d, 1H, ³ J = 8.8 Hz, 5H-Chromen), 7.10 (s, 1H, CH=C), 6.58 (dd, 1H, ³ J = 8.8 Hz, ⁴ J = 2.5 Hz, 6H-Chromen), 6.50 (d, 1H, ³ J = 2.4 Hz, 8H-Chromen), 3.86 (br s, 2H, -NH ₂), 3.39 (q, 4H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂), 1.20 (t, 6H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂)
ESI-MS:	m/z = 259.0 [M-H] ⁺

3-(4-(5-(4-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethylester (295)^{nach[267]}



Eine Lösung aus 159 mg 4-Dimethylaminophthalimid **232** (0.84 mmol, 1.2 eq) und 47 mg Kaliumhydroxid (0.84 mmol, 1.0 eq) in 10 mL abs. EtOH wird für 1 Stunden auf 70 °C erwärmt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wird in 5 mL abs. DMF gelöst und eine Lösung aus 300 mg 3-(4-(5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethylester (**294**) (0.70 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. DMF wird hinzugegeben. Die gelbe Lösung wird für 18 Stunden bei 80 °C gerührt.

Die gelbe, klare Reaktionsmischung wird auf 35 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein gelber Feststoff bildet. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

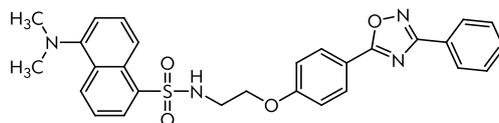
Ausbeute:	375 mg (quant.)
Summenformel:	C ₃₀ H ₂₈ N ₄ O ₆

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

<i>Molmasse:</i>	540.57 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelber Feststoff
<i>R_F-Wert:</i>	0.29 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 8.13-8.05 (m, 4H, 3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Ph-(CH ₂) ₂ COOMe + 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Ph-O-), 7.66 (d, 1H, ³ <i>J</i> = 8.4 Hz, 6 <i>H</i> -Pht), 7.33 (d, 2H, ³ <i>J</i> = 8.1 Hz, 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Ph-(CH ₂) ₂ COOMe), 7.08 (d, 1H, ³ <i>J</i> = 1.6 Hz, 3 <i>H</i> -Pht), 7.02 (d, 2H, ³ <i>J</i> = 8.7 Hz, 3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Ph-O-), 6.79 (dd, 1H, ³ <i>J</i> = 8.4 Hz, ⁴ <i>J</i> = 1.9 Hz, 5 <i>H</i> -Pht), 4.30 (t, 2H, ³ <i>J</i> = 5.6 Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 4.10 (t, 2H, ³ <i>J</i> = 5.7 Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 3.68 (s, 3H, -COOCH ₃), 3.12 (s, 6H, -N(CH ₃) ₂), 3.03 (t, 2H, ³ <i>J</i> = 7.6 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.68 (t, 2H, ³ <i>J</i> = 7.7 Hz, Ph-CH ₂ -CH ₂ -).
<i>ESI-MS:</i>	<i>m/z</i> = 542.0 [M+H] ⁺ , 564.1 [M+Na] ⁺

8.1.4 Synthese der fluoreszenzmarkierten S1P₁-Tools

5-(Dimethylamino)-N-(2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethyl)naphthalin-1-sulfonamid (ST-1350 (209))



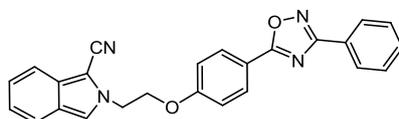
Eine Lösung aus 100 mg 2-(4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethanamin (**208**) (0.36 mmol, 1.0 eq) und 96 mg Dansylchlorid (0.36 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. DMF wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die klare Reaktionsmischung wird auf ca. 10 mL Wasser gegeben und fünfmal mit je ca. 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	88 mg (48%)
Summenformel:	C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₄ S*0.25 C ₄ H ₈ O ₂
Molmasse:	524.57 g/mol
Aussehen:	gelber, glasartiger Feststoff
Bezeichnung:	AL268, ST-1350
R _F -Wert:	0.48 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.52 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 8H-Naphthalin), 8.31-8.24 (m, 2H, 2H,3H-Naphthalin), 8.18-8.14 (m, 2H, 4H,7H-Naphthalin), 8.04 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.56-7.50 (m, 5H, 3H,5H-Ph-O- + 3H,4H,5H-Ph), 7.11 (d, 1H, ³ J = 7.5 Hz, 6H-Naphthalin), 6.72 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph), 5.22 (t, 1H, ³ J = 6.1 Hz, NH), 3.88 (t, 2H, ³ J = 5.0 Hz, NH-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph-), 3.39 (pq, 2H, NH-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph), 2.85 (s, 6H, N-(CH ₃) ₂).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 175.1, 168.0, 161.7, 151.2, 136.1, 131.5, 129.6, 129.3, 129.1, 129.0, 128.9, 128.1, 127.7, 127.0, 126.2, 123.4, 119.1, 115.6, 115.1, 115.0, 66.5, 45.0, 41.6.
ESI-MS:	m/z = 515.8 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 64.91, H 5.26, N 10.44, S 5.98 Gef.: C 64.97, H 5.42, N 10.11, S 5.86

2-(2-(4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethyl)-2H-isoindol-1-carbonitril (ST-1221 (210)) ^{nach [279]}



Zu einer Lösung aus 147 mg 2-(4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethanamin (**208**) (0.52 mmol, 1.0 eq) in 6 mL abs. MeOH werden 26 mg Natriumcyanid (0.53 mmol, 1.0 eq) und 72 mg (0.54 mmol, 1.03 eq) o-Phthaldialdehyd zugegeben und 15 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt.

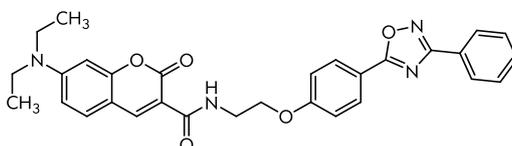
Dier entstandene gelbe Suspension wird abgenutscht und der Feststoff mit etwas MeOH nachgewaschen.

Ausbeute:	109 mg (51%)
Summenformel:	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ O ₂ * 0.25 C ₄ H ₈ O ₂
Molmasse:	406.44 g/mol
Aussehen:	beiger Feststoff
Bezeichnung:	AL274, ST-1221

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

R_f -Wert:	0.44 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):	δ = 8.16-8.13 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.68-7.63 (m, 2H, 5H,6H-Isoindol), 7.54-7.49 (m, 4H, 4H-Isoindol + 3H,4H,5H-Ph), 7.28-7.24 (m, 1H, 7H-Isoindol), 7.14-7.10 (m, 1H, 3H-Isoindol), 7.03 (d, 2H, 3J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph), 4.79 (t, 1H, 3J = 5.0 Hz, N- CH_2 - CH_2 -O-Ph-), 4.48 (t, 2H, 3J = 5.0 Hz, N- CH_2 - CH_2 -O-Ph).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, DMSO-d_6):	δ = 175.1, 168.0, 161.5, 131.5, 130.7, 129.9, 129.1, 127.0, 126.1, 125.3, 123.5, 122.2, 121.3, 121.2, 117.1, 116.1, 115.4, 114.1, 92.6, 67.3, 49.0.
Schmelzpunkt:	176 °C
ESI-MS:	m/z = 407.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$
CHN:	Ber.: C 64.91, H 5.26, N 10.44, S 5.98 Gef.: C 64.97, H 5.42, N 10.11, S 5.86

7-(Diethylamino)-2-oxo-N-(2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethyl)-2H-chromen-3-carboxamid (ST-1349 (214)) nach^[273]



Eine Lösung aus 68 mg 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (**213**) (0.26 mmol, 1.0 eq), 40 mg HOBT*H₂O (0.26 mmol, 1.0 eq), 0,05 mL EDC (0.26 mmol, 1.0 eq) in 3mL abs. DMF wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 74 mg 2-(4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethanamin (**208**) (0.26 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Mischung wird in der Mikrowelle 10 min bei 100 °C behandelt.

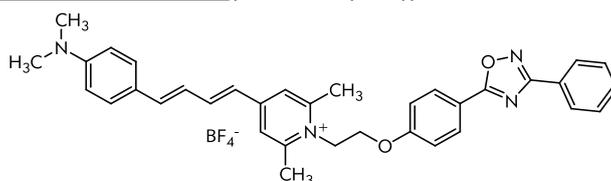
Die gelbe Suspension wird auf ca. 20 mL Wasser geben und ca. 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen.

Das Rohprodukt wird aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute:	75 mg (54%)
Summenformel:	$\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$
Molmasse:	524.57 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL237, ST-1349
R_f -Wert:	0.13 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	δ = 9.18 (t, 1H, 3J = 5.0 Hz, NH), 8.71 (s, 1H, CH=C), 8.17-8.14 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.51-7.59 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.43 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz, 5H-Chromen), 7.08 (d, 2H, 3J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 6.63 (dd, 1H, 3J = 8.9 Hz, 4J = 2.0 Hz, 6H-Chromen), 6.49 (d, 1H, 4J = 1.6 Hz, 8H-Chromen), 4.25 (t, 2H, 3J = 5.3 Hz, NH- CH_2 - CH_2 -O-Ph-), 3.89 (pq, 2H, NH- CH_2 - CH_2 -O-Ph), 3.45 (q, 4H, 3J = 7.0 Hz, N-(CH_2 - CH_3) ₂), 1.23 (t, 6H, 3J = 7.0 Hz, N-(CH_2 - CH_3) ₂).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	δ = 175.6, 168.8, 163.6, 162.7, 162.3, 157.7, 152.6, 148.2, 131.2, 131.0, 130.1, 128.8, 127.5, 127.2, 117.1, 115.2, 115.1, 110.0, 108.3, 96.6, 66.9, 45.1, 39.0, 12.4.
Schmelzpunkt:	212 °C
ESI-MS:	m/z = 455.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 523.19814 $[\text{M}-\text{H}]^-$ Gef.: m/z = 523.19794 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Δ : 0.4 ppm)

8.1.4 Synthese der fluoreszenzmarkierten S1P1-Tools

4-((1E,3E)-4-(4-(Dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dienyl)-2,6-dimethyl-1-(2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethyl)pyridinium Tetrafluorborat (ST-1351 (217)) nach [270]



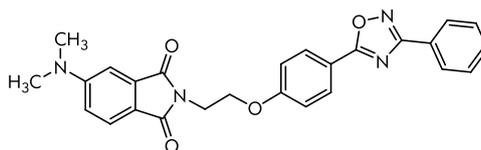
Eine Lösung aus 100 mg 2-(4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethanamin (**216**) (0.36 mmol, 1.0 eq) und 50 μ L Triethylamin (0.35 mmol, 1.0 eq) in 6 mL eines 1:1 Gemisches aus abs. MeCN und abs. DMF wird ca. 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 130 mg 4-((1E,3E)-4-(4-(Dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dienyl)-2,6-dimethylpyrylium Tetrafluorborat (**216**) (0.36 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Mischung wird 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die blutrote Reaktionsmischung wird auf ca. 30 mL Wasser gegeben und 20 min gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt in Dichlormethan gelöst, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird aus DCM/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute:	122 mg (54%)
Summenformel:	$\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_2 + \text{BF}_4$
Molmasse:	543.68 g/mol + 87.00 g/mol
Aussehen:	schwarz-roter Feststoff
Bezeichnung:	AL252, ST-1351
R_f -Wert:	0.08 (DCM/MeOH ges. NH_3 9:1)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6):	$\delta = 8.15$ (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2H,6H-Ph-O-), 8.09-8.06 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.90 (2, 2H, Pyridinium), 7.78-7.70 (m, 1H, -CH=CH-CH=CH-Pyridinium), 7.61-7.58 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.47 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2H,6H-PhNMe ₂), 7.21 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 7.02-6.98 (m, 2H, -CH=CH-CH=CH-Pyridinium), 6.72 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3H,5H-PhNMe ₂), 6.60 (d, 1H, $^3J = 14.6$ Hz, -CH=CH-CH=CH-Pyridinium), 4.93 (br t, 1H, N-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph-), 4.62 (br t, 2H, N-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph), 3.34 (s, 6H, N-(CH ₃) ₂), 2.98 (s, 3H, Pyridinium-CH ₃), 2.89 (s, 3H, Pyridinium-CH ₃).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, DMSO-d_6):	$\delta = 175.0, 168.0, 161.3, 154.9, 152.2, 151.0, 143.2, 141.8, 131.5, 129.9, 129.2, 129.0, 127.0, 126.1, 123.4, 123.1, 122.8, 122.6, 116.3, 115.4, 111.9, 65.9, 50.3, 39.7, 21.2.$
ESI-MS:	$m/z = 543.9$ [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 66.68, H 5.60, N 8.89 Gef.: C 66.52, H 5.75, N 8.19

5-(Dimethylamino)-2-(2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethyl) isoindolin-1,3-dion (ST-1346 (234))



Methode 1:

Eine Lösung aus 100 mg 4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (**195**) (0.34 mmol, 1.0 eq) und 219 mg Caesiumcarbonat (0.67 mmol, 2.0 eq) in 3 mL abs. DMF wird für 45 min. bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird eine Lösung aus 180 mg N-(2-Bromethyl)-4-Dimethylaminophthalimid (**227**) (0.61 mmol, 1.8 eq) in 5 mL abs. DMF und eine Spatelspitze Natriumiodid zugegeben und die Lösung für 48 Stunden bei 50 °C gerührt.

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Die gelbe Reaktionsmischung wird auf 50 mL Wasser gegeben und ca. 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei entstandene Feststoff wird abgesaugt und säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 41 mg (27%)

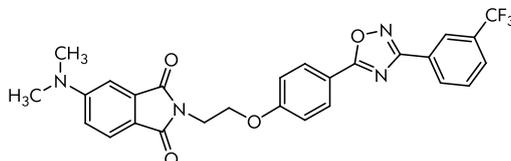
Methode 2: nach^[267]

Eine Lösung aus 85 mg 4-Dimethylaminophthalimid (**232**) (0.45 mmol, 1.0 eq) und 25 mg Kaliumhydroxid (0.45 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. EtOH wird für 2 Stunden auf 70 °C erwärmt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand (**237**) wird in 3 mL abs. DMF gelöst und eine Lösung aus 150 mg 5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**235**) (0.44 mmol, 1.0 eq) in 3 mL abs. DMF wird hinzugegeben. Die gelbe Lösung wird für 24 Stunden bei 80 °C gerührt.

Die gelbe, klare Reaktionsmischung wird auf 30 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein gelber Feststoff bildet. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	120 mg (60%)
Summenformel:	C ₂₆ H ₂₂ N ₄ O ₄
Molmasse:	454.48 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL230, ST-1346
R _F -Wert:	0.38 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.10-8.03 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.59 (d, 1H, ³ J = 8.5 Hz, 6H-Pht), 7.45-7.41 (m, 3H, 3H,4H, 5H-Ph), 7.01 (d, 1H, ³ J = 2.4 Hz, 3H-Pht), 6.96 (d, 2H, ³ J = 9.0 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 6.73 (dd, 1H, ³ J = 8.5 Hz, ⁴ J = 2.4 Hz, 5H-Pht), 4.24 (t, 2H, ³ J = 5.9 Hz, Pht-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph-), 4.03 (t, 2H, ³ J = 6.2 Hz, Pht-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph), 3.05 (s, 6H, 2x CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 175.7, 168.8, 162.0, 161.6, 134.7, 131.0, 130.0, 128.8, 127.5, 127.2, 124.9, 124.3, 117.2, 115.1, 114.7, 105.8, 65.2, 40.4, 36.8
Schmelzpunkt:	175 °C
ESI-MS:	m/z = 455.6 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 68.71, H 4.88, N 12.33 Gef.: C 68.45, H 5.16, N 11.94

5-(Dimethylamino)-2-(2-(4-(3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl) phenoxy)ethyl)isoindolin-1,3-dion (ST-1347 (238)) nach^[267]



Eine Lösung aus 47 mg 4-Dimethylaminophthalimid (**232**) (0.25 mmol, 1.0 eq) und 14 mg Kaliumhydroxid (0.25 mmol, 1.0 eq) in 4 mL abs. EtOH wird für 2 Stunden auf 70 °C erwärmt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wird in 2 mL abs. DMF gelöst und eine Lösung aus 100 mg 5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-3-(3-(trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol (**237**) (0.24 mmol, 1.0 eq) in 3 mL abs. DMF wird hinzugegeben. Die gelbe Lösung wird für 2 Tage bei 80 °C gerührt.

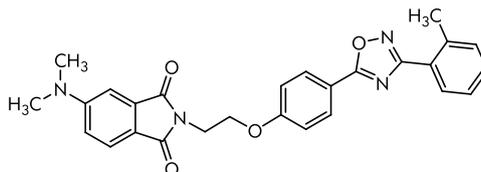
Die gelbe, klare Reaktionsmischung wird auf 15 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein gelber Feststoff bildet. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute:	85 mg (67%)
Summenformel:	C ₂₇ H ₂₁ F ₃ N ₄ O ₄

8.1.4 Synthese der fluoreszenzmarkierten S1P1-Tools

Molmasse:	522.48 g/mol
Aussehen:	hellgelber, feinpulvriger Feststoff
Bezeichnung:	AL304, ST-1347
R _F -Wert:	0.47 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.44 (s, 1H, 1H-PhCF ₃), 8.34 (d, 1H, ³ J = 7.7 Hz, 6H-PhCF ₃), 8.13 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.77 (d, 1H, ³ J = 7.7 Hz, 6H-Pht), 7.68-7.62 (m, 2H, 4H,5H,-PhCF ₃), 7.09 (d, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, 3H-Pht), 7.04 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 6.80 (dd, 1H, ³ J = 8.5 Hz, ⁴ J = 2.0 Hz, 5H-Pht), 4.31 (t, 2H, ³ J = 5.8 Hz, Pht-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph-), 4.10 (t, 2H, ³ J = 5.8 Hz, Pht-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph), 3.12 (s, 6H, 2x CH ₃).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃):	δ = 182.5, 170.4, 169.9, 167.8, 159.1, 154.4, 134.1, 131.6, 130.6, 130.2, 130.1, 129.4, 127.9, 125.4, 124.9, 121.7, 117.4, 115.3, 115.2, 114.7, 105.8, 65.2, 40.5, 36.8
Schmelzpunkt:	172 °C
ESI-MS:	m/z = 523.8 [M+H] ⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 521.14366 [M-H] ⁻ Gef.: m/z = 521.14315 [M-H] ⁻ (Δ: 0.9 ppm)

5-(Dimethylamino)-2-(2-(4-(3-o-tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)ethyl) isoindolin-1,3-dion (240) nach^[267] (ST-1348)



Eine Lösung aus 66 mg 4-Dimethylaminophthalimid (**232**) (0.35 mmol, 1.0 eq) und 20 mg Kaliumhydroxid (0.35 mmol, 1.0 eq) in 7 mL abs. EtOH wird für 2 Stunden auf 70 °C erwärmt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wird in 8 mL abs. DMF gelöst und eine Lösung aus 123 mg 5-(4-(2-Bromethoxy)phenyl)-3-o-tolyl-1,2,4-oxadiazol (**239**) (0.44 mmol, 1.0 eq) in 3 mL abs. DMF wird hinzugegeben. Die gelbe Lösung wird für 22 Stunden bei 80 °C gerührt.

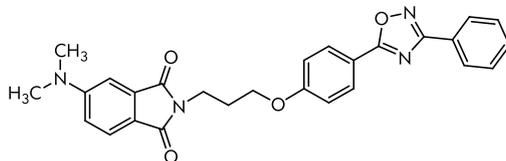
Die gelbe, klare Reaktionsmischung wird auf 50 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein gelber Feststoff bildet. Die Suspension wird ca. 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat und Ethylacetat/Dichlormethan umkristallisiert.

Ausbeute:	105 mg (65%)
Summenformel:	C ₂₇ H ₂₄ N ₄ O ₄ *0.5 H ₂ O
Molmasse:	468.50 g/mol
Aussehen:	gelber, voluminöser Feststoff
Bezeichnung:	AL271, ST-1348
R _F -Wert:	0.4 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.13 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 8.06-8.04 (m, 1H, 6H-Tolyl), 7.66 (d, 1H, ³ J = 8.5 Hz, 6H-Pht), 7.41-7.37 (m, 1H, 5H-Tolyl), 7.34-7.30 (m, 2H, 3H,4H-Tolyl), 7.09 (d, 1H, ⁴ J = 2.3 Hz, 3H-Pht), 7.03 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 6.80 (dd, 1H, ³ J = 8.5 Hz, ⁴ J = 2.4 Hz, 5H-Pht), 4.31 (t, 2H, ³ J = 5.9 Hz, Pht-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph-), 4.10 (t, 2H, ³ J = 5.9 Hz, Pht-CH ₂ -CH ₂ -O-Ph), 3.12 (s, 6H, 2x CH ₃), 2.67 (s, 3H, PhCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 174.5, 169.4, 169.0, 162.0, 154.5, 138.2, 134.7, 131.3, 130.4, 130.1, 130.0, 126.4, 126.0, 125.0, 117.5, 117.2, 115.2, 114.7, 105.8, 65.2, 40.5, 36.8, 22.0

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Schmelzpunkt:	196 °C
ESI-MS:	m/z = 469.6 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 67.91, H 5.28, N 11.73
	Gef.: C 67.98, H 5.03, N 11.62

5-(Dimethylamino)-2-(2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)propyl) isoindolin-1,3-dion (ST-1352 (242)) nach [267]



Eine Lösung aus 100 mg 4-Dimethylaminophthalimid (**232**) (0.53 mmol, 1.0 eq) und 30 mg Kaliumhydroxid (0.53 mmol, 1.0 eq) in 7 mL abs. EtOH wird für 2 Stunden auf 70 °C erwärmt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wird in 8 mL abs. DMF gelöst und eine Lösung aus 162 mg 5-(4-(2-Brompropoxy)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**241**) (0.45 mmol, 1.0 eq) in 4 mL abs. DMF wird hinzugegeben. Die gelbe Lösung wird für 22 Stunden bei 80 °C gerührt.

Die gelbe, klare Reaktionsmischung wird auf 350 mL Wasser gegeben woraufhin sich ein gelber Feststoff bildet. Die Suspension wird für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

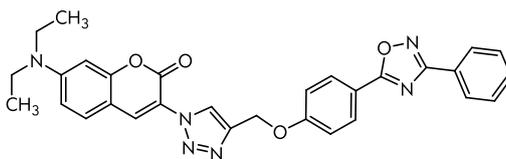
Ausbeute:	129 mg (61%)
Summenformel:	C ₂₇ H ₂₄ N ₄ O ₄
Molmasse:	468.50 g/mol
Aussehen:	gelber, voluminöser Feststoff
Bezeichnung:	AL264, ST-1352
R _f -Wert:	0.37 (Hex/EE 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.18-8.09 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.64 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, 6H-Pht), 7.151-7.49 (m, 3H, 3H,4H, 5H-Ph), 7.06 (d, 1H, ⁴J = 2.2 Hz, 3H-Pht), 6.95 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 6.79 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 5H-Pht), 4.12 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, Pht-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph-), 3.88 (t, 2H, ³J = 6.7 Hz, Pht-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph), 3.11 (s, 6H, 2x CH₃), 2.21 (qui, 2H, ³J = 6.4 Hz, Pht-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 175.7, 169.2, 168.8, 162.5, 154.4, 134.8, 131.1, 131.1, 130.1, 130.0, 128.8, 127.5, 127.2, 124.8, 116.9, 115.0, 114.6, 111.5, 105.8, 66.1, 40.5, 35.0, 28.4.

Schmelzpunkt:	178 °C
ESI-MS:	m/z = 470.1 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 69.22, H 5.16, N 11.96
	Gef.: C 69.09, H 5.16, N 12.09

7-(Diethylamino)-3-(4-((4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromen-2-on (ST-1354 (255)) nach[454]



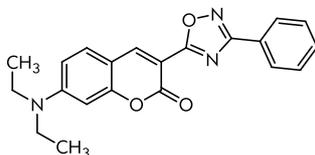
Zu einer Suspension aus 225 mg 3-Phenyl-5-(4-(prop-2-ynyloxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol (**254**) (0.81 mmol, 1.0 eq), 186 mg 3-Azido-7-(diethylamino)- 2H-chromen-2-on (**245**) (0.6001 mmol, 1.0 eq) in 4 mL eines 1:1 Gemisches aus Dichlormethan und Wasser werden 0.12 mL einer 1M Natriumaskorbatlösung in Wasser (0.33 mmol, 0.4 eq) und 92 µl einer 7.5% igen Kupfersulfatpentahydrat-Lösung in Wasser (0.16 mmol, 0.2 eq) zugegeben.

8.1.4 Synthese der fluoreszenzmarkierten SIP1-Tools

Die feststoffhaltige Reaktionsmischung wird für 16 Stunden bei Raumtemperatur, im Dunklen gerührt.
Die feststoffhaltige Reaktionsmischung wird mit ca. 10 mL des 1:1-Gemisches aus Dichlormethan und Wasser verdünnt und abgenutscht.

Ausbeute:	322 mg (74%)
Summenformel:	C ₃₀ H ₂₆ N ₆ O ₄
Molmasse:	543.57 g/mol
Aussehen:	dunkelgelber Feststoff
Bezeichnung:	AL331, ST-1354
R _f -Wert:	0.42 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.63 (s, 1H, 1H-Triazol), 8.35 (s, 1H, CH=C), 8.12-8.09 (m, 4H, 2H,6H-Ph + 2H,6H-Ph-O-), 7.45-7.42 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.34 (d, 1H, ³ J = 8.8 Hz, 5H-Chromen), 7.11 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 6.61 (dd, 1H, ³ J = 9.0 Hz, ⁴ J = 2.0 Hz, 6H-Chromen), 6.49 (d, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, 8H-Chromen), 5.31 (s, 2H, -CH ₂ -O-), 3.39 (q, 4H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂), 1.18 (t, 6H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂).
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ = 175.5, 167.9, 161.8, 158.3, 155.9, 151.7, 142.4, 134.9, 131.0, 130.1, 128.8, 127.2, 125.8, 124.0, 117.4, 115.4, 110.1, 107.0, 97.0, 62.0, 45.0, 12.4
Schmelzpunkt:	202.5 °C
ESI-MS:	m/z = 362.4 [M+H] ⁺
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 535.20938 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 535.21088 [M+H] ⁺ (Δ: 2.8 ppm)

7-(Diethylamino)-3-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-2H-chromen-2-on, (ST-1353 (271)) nach [273]



Einer Lösung aus 250 mg 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (**213**) (0.96 mmol, 1.0 eq), 147 mg HOBt*H₂O (0.96 mmol, 1.0 eq), 0.17 mL EDC (0.96 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. DMF wird bei Raumtemperatur ca. 30 min gerührt.

Dann wird eine Lösung aus 130 mg (Z)-N'-Hydroxybenzamidin (**191**) (0.96 mmol, 1.0 eq) in 3 mL abs. DMF zugegeben und die Mischung in der Mikrowelle 20 min bei 150 °C erhitzt.

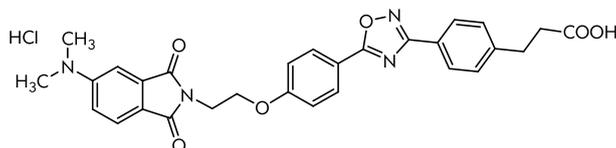
Die gelbliche Mischung wird auf ca. 50 mL Eiswasser gegeben wobei ein gelber voluminöser Feststoff ausfällt. Die Suspension wird ca. 45 min lang gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und lyophilisiert.

Ausbeute:	283 mg (82%)
Summenformel:	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃ *0.5 H ₂ O
Molmasse:	361.39 g/mol
Aussehen:	gelber, voluminöser Feststoff
Bezeichnung:	AL327, ST-1353
R _f -Wert:	0.36 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.64 (s, 1H, CH=C), 8.20-8.16 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.51-7.42 (m, 4H, 3H,4H,5H-Ph + 5H-Chromen), 6.66 (dd, 1H, ³ J = 8.6 Hz, ⁴ J = 2.4 Hz, 6H-Chromen), 6.53 (d, 1H, ⁴ J = 2.2 Hz, 8H-Chromen), 3.46 (q, 4H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂), 1.26 (t, 6H, ³ J = 7.1 Hz, N-(CH ₂ -CH ₃) ₂).

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 173.5, 167.5, 158.0, 156.7, 153.2, 147.7, 132.0, 132.0, 131.5, 129.2, 127.0, 126.4, 110.3, 107.5, 102.0, 96.1, 44.5, 12.4.$
Schmelzpunkt:	193 °C
ESI-MS:	$m/z = 362.4 [\text{M}+\text{H}]^+$
CHN:	Ber.: C 68.09, H 5.44, N 11.34 Gef.: C 67.89, H 5.34, N 11.38

3-(4-(5-(4-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäure Hydrochlorid (ST-1436 (297)) nach^[318]

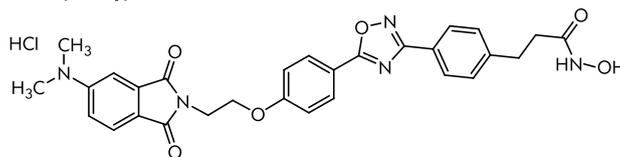


Eine Suspension aus 100 mg 3-(4-(5-(4-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)propansäuremethyl (**295**) (0.19 mmol, 1.0 eq) in 0.3 mL Eisessigsäure, 0.02 mL konz. HCl und drei Tropfen Wasser wird im verschlossenen Vial für 1.5 Stunden auf 90 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus Aceton umkristallisiert. Das Rohprodukt wird im Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Ausbeute:	78 mg (75%)
Summenformel:	$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot \text{HCl}$
Molmasse:	526.19 g/mol + 36.46 g/mol
Aussehen:	hellgelber Feststoff
Bezeichnung:	AL386, ST-1436
R_f -Wert:	0.08 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):	$\delta = 12.17$ (br s, 1H, -COOH), 8.08 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.98 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 3H,5H-Ph-(CH_2) ₂ COOMe), 7.63 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, 6H-Pht), 7.45 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 2H,6H-Ph-(CH_2) ₂ COOMe), 7.15 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 7.04 (d, 1H, $^3J = 2.2$ Hz, 3H-Pht), 6.92 (dd, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, 5H-Pht), 4.33 (t, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, O- CH_2 - CH_2 -Pht), 3.95 (t, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, O- CH_2 - CH_2 -Pht), 3.08 (s, 6H, - $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.91 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Ph- CH_2 - CH_2 -), 2.60 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Ph- CH_2 - CH_2 -).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):	$\delta = 174.9, 173.4, 168.0, 167.6, 161.8, 154.2, 144.6, 142.8, 134.0, 129.8, 129.0, 127.0, 124.4, 124.0, 116.1, 115.9, 115.4, 114.8, 105.2, 65.1, 39.9, 36.4, 34.6, 30.1.$
Schmelzpunkt:	199.4 °C
ESI-MS:	$m/z = 525.17 [\text{M}-\text{H}]^-$, 561.18 $[\text{M}-\text{H}]^- + \text{Cl}^-$
MALDI-HRMS:	Berechnet: $m/z = 527.19385 [\text{M}+\text{H}]^+$ Gefunden: $m/z = 527.19393 [\text{M}+\text{H}]^+$ (Δ : 0.2 ppm)
CHN:	Ber.: C 61.87, H 4.83, N 9.95 Gef.: C 61.75, H 4.95, N 9.78

8.1.4 Synthese der fluoreszenzmarkierten S1P1-Tools

3-(4-(5-(4-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl)-N-hydroxypropanamid (ST-1455 (302))^[322]



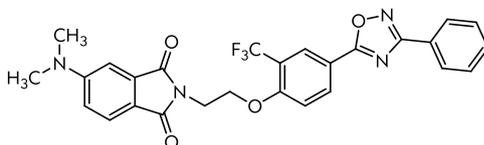
Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 35 mg 3-(4-(5-(4-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl) propansäure Hydrochlorid, **ST-1436 (297)**, (0.07 mmol, 1.0 eq) in 0.25 mL abs. DMF und 14 µL Triethylamin (0.1 mmol, 1.5 eq) wird 1 µL Ethylchloroformat (0.1 mmol, 1.5 eq) gegeben und die Mischung für eine Stunde bei 0 °C gerührt.

Dann werden 0.1 mL 50%ige Hydroxylamin-Lösung in Wasser (1.33 mmol, 20 eq) dazugegeben und für 50 min bei Raumtemperatur gerührt.

Der gelblichen Reaktionsmischung werden ca. 2 mL Wasser zugesetzt woraufhin ein Feststoff ausfällt. Die Suspension wird 10 min gerührt und der Feststoff wird abgesaugt und mit ca. 3 mL Wasser nachgewaschen. Das Rohprodukt wird in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

<i>Ausbeute:</i>	33 mg (86%)
<i>Summenformel:</i>	C ₂₉ H ₂₇ N ₅ O ₆ * HCl
<i>Molmasse:</i>	541.55 g/mol + 36.46 g/mol
<i>Aussehen:</i>	hellgelber, voluminöser Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL453, ST-1455
<i>R_F-Wert:</i>	0.08 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 10.41 (br s, 1H, -CONHOH), 8.75 (br s, 1H, -C(O)NHOH), 8.07 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.97 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 3H,5H-Ph-(CH ₂) ₂ COOMe), 7.61 (d, 1H, ³ J = 8.1 Hz, 6H-Pht), 7.41 (d, 2H, 2H,6H-Ph-(CH ₂) ₂ COOMe), 7.13 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 7.03 (s, 1H, 3H-Pht), 6.92 (d, 1H, ³ J = 8.5 Hz, 5H-Pht), 4.32 (t, 2H, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 3.95 (t, 2H, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 3.07 (s, 6H, -N(CH ₃) ₂), 2.90 (t, 2H, Ph-CH ₂ -CH ₂ -), 2.32 (t, 2H, Ph-CH ₂ -CH ₂ -).
<i>¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 178.8, 171.5, 167.3, 166.5, 162.5, 155.0, 147.6, 139.0, 134.0, 130.1, 129.5, 127.5, 125.1, 122.8, 116.9, 115.9, 115.3, 114.8, 105.6, 65.8, 39.9, 40.4, 37.0, 33.7, 31.1.
<i>Schmelzpunkt:</i>	181.6 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 541.1 [M-H] ⁻ , 577.1 [M-H] ⁻ + Cl ⁻
<i>CHN:</i>	Ber.: C 60.26, H 4.88, N 12.12 Gef.: C 60.38, H 4.56, N 11.74

5-(Dimethylamino)-2-(2-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-2-(trifluormethyl)phenoxy) ethyl)isoindolin-1,3-dion (ST-1628 (315))^{nach[267]}



Eine Lösung aus 110 mg 4-Dimethylaminophthalimid (**231**) (0.58 mmol, 1.2 eq) und 33 mg Kaliumhydroxid (0.58 mmol, 1.2 eq) in 10 mL abs. EtOH wird für 1 Stunden auf 70 °C erwärmt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wird in 5 mL abs. DMF gelöst und eine Lösung aus 200 mg 5-(4-(2-Bromethoxy)-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**314**) (0.48 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. DMF wird hinzugegeben. Die Mischung für 24 Stunden bei 80 °C gerührt.

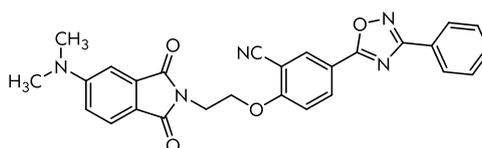
Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die klare gelbe Reaktionsmischung auf 15 mL Eiswasser gegeben, woraufhin ein gelber Feststoff ausfällt. Der Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen wird. Das Rohprodukt wird in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

<i>Ausbeute:</i>	230 mg (84%)
------------------	--------------

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

Summenformel:	$C_{27}H_{21}F_3N_4O_4 \cdot H_2O$
Molmasse:	522.48 g/mol + 18 g/mol
Aussehen:	hellgelber, feinkörniger Feststoff
Bezeichnung:	AL559, ST-1628
R_f -Wert:	0.41 (Hex/EE 1:1)
1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6):	$\delta = 8.41$ (dd, 1H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 6H-PhCF ₃), 8.25 (d, 1H, $^4J = 2.0$ Hz, 2H-PhCF ₃), 8.11-8.07 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.64-7.57 (m, 5H, 3H,4H,5H-Ph + 5H-PhCF ₃ + 6H-Pht), 7.04 (d, 1H, $^4J = 2.2$ Hz, 3H-Pht), 6.92 (dd, 1H, $^4J = 2.4$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 5H-Pht), 4.52 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 4.00 (t, 2H, $^3J = 5.2$ Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 3.08 (s, 6H, -N(CH ₃) ₂).
^{13}C -NMR (63 MHz, DMSO- d_6):	$\delta = 174.2, 168.2, 168.1, 167.6, 154.3, 153.2, 134.2, 134.1, 131.7, 131.7, 129.3, 127.2, 127.1, 126.0, 124.5, 116.4, 115.8, 114.9, 114.9, 112.6, 105.1, 65.9, 40.0, 36.1.$
Schmelzpunkt:	187.5 °C
ESI-MS:	m/z = 522.9 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 60.00, H 4.29, N 10.37 Gef.: C 59.67, H 3.95, N 10.03

2-(2-(5-(Dimethylamino)-1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethoxy)-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril (ST-1627 (319)) nach[267]



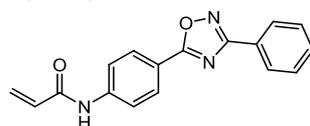
Eine Lösung aus 47 mg 4-Dimethylaminophthalimid (**232**) (0.25 mmol, 1.2 eq) und 14 mg Kaliumhydroxid (0.25 mmol, 1.2 eq) in 5 mL abs. EtOH wird für 1 Stunden auf 70 °C erwärmt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wird in 5 mL abs. DMF gelöst und eine Lösung aus 76 mg 2-(2-Bromethoxy)-5-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzonitril (**318**) (0.21 mmol, 1.0 eq) in 3 mL abs. DMF wird hinzugegeben. Die Mischung für 19 Stunden bei 80 °C gerührt.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die klare gelbe Reaktionsmischung auf 15 mL Eiswasser gegeben, woraufhin ein gelber Feststoff ausfällt. Der Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen wird. Das Rohprodukt wird in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Ausbeute:	93 mg (93%)
Summenformel:	$C_{27}H_{21}N_5O_4 \cdot 0.6 H_2O$
Molmasse:	479.49 g/mol + 10.8 g/mol
Aussehen:	hellgelber, feinkörniger Feststoff
Bezeichnung:	AL567, ST-1627
R_f -Wert:	0.43 (Hex/EE 1:1)
1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6):	$\delta = 8.41$ (s, 1H, 6H-PhCN), 8.35 (d, 1H, $^3J = 8.8$ Hz, 3H-PhCN), 8.14 (d, 2H, $^3J = 5.7$ Hz, 2H,6H-Ph), 7.67 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, 4H-PhCN), 7.52-7.50 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.19 (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, 6H-Pht), 7.09 (d, 1H, $^4J = 1.5$ Hz, 3H-Pht), 6.80 (dd, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, 5H-Pht), 4.45 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 4.16 (t, 2H, $^3J = 6.1$ Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Pht), 3.11 (s, 6H, -N(CH ₃) ₂).
^{13}C -NMR (63 MHz, DMSO- d_6):	$\delta = 182.8, 180.3, 178.7, 178.5, 175.6, 169.3, 134.0, 131.4, 129.1, 128.9, 127.5, 126.6, 125.1, 121.8, 119.5, 117.5, 115.0, 112.8, 106.1, 103.8, 97.1, 66.0, 40.6, 30.9.$
Schmelzpunkt:	231 °C
ESI-MS:	m/z = 480.6 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 66.14, H 4.56, N 14.28 Gef.: C 66.22, H 4.51, N 13.88

8.1.5 Synthese der kovalent Labeling S1P₁-Tools

N-(4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenyl)acrylamid (ST-1426 (276))^[313]

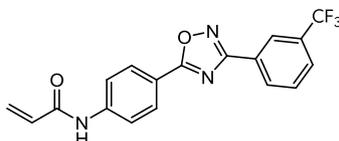


Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 245 mg 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)anilin (**275**) (1.03 mmol, 1.0 eq) in 10 mL abs. CHCl₃ und 140 µL Triethylamin (1.03 mmol, 1.0 eq) wird eine Lösung aus 10 mL abs. CHCl₃ und 87 µL Acrylsäurechlorid (1.03 mmol, 1.0 eq) zugetropft. Die Mischung wird anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach sechs Stunden werden 43 µL Acrylsäurechlorid (0.5 eq) zugegeben.

Die Reaktionsmischung wird zweimal mit je ca. 25 mL ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Dichlormethan umkristallisiert.

Ausbeute:	290 mg (96%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₃ N ₃ O ₂ *0.25 H ₂ O
Molmasse:	291.30 g/mol
Aussehen:	weißer, feinkristalliner, hygroskopischer Feststoff
Bezeichnung:	AL358, ST-1426
R _F -Wert:	0.45 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.60 (s, 1H -NH-), 8.18 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph-NH-), 8.11-8.07 (m, 2H, 2H,6H-Ph), 7.96 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-NH-), 7.62-7.56 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 6.49 (dd, 1H, ³ J = 9.8 Hz, H ₂ C=CH-), 6.33 (dd, 1H, ² J = 2.1 Hz, ³ J = 19.0 Hz, (E)-H ₂ C=CH-), 5.84 (dd, 1H, ² J = 2.1 Hz, ³ J = 9.8 Hz, (Z)-H ₂ C=CH-).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 175.0, 168.1, 163.6, 143.4, 131.5, 131.4, 129.2, 129.0, 127.9, 127.0, 126.2, 119.4, 117.8.
Schmelzpunkt:	185 °C
ESI-MS:	m/z = 290.10 [M-H] ⁻
CHN:	Ber.: C 69.03, H 4.60, N 14.21 Gef.: C 69.25, H 4.52, N 14.21
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 292.10805 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 292.10844 [M+H] ⁺ (Δ: 1.3 ppm)

N-(4-(3-(3-(Trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenyl)acrylamid (ST-1432 (279))^[313]



Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 102 mg 4-(3-(3-(Trifluormethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)anilin (**278**) (0.33 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. CHCl₃ und 60 µL mL Triethylamin (0.33 mmol, 1.0 eq) wird eine Lösung aus 5 mL abs. CHCl₃ und 28 µL Acrylsäurechlorid (0.33 mmol, 1.0 eq) zugetropft. Die Mischung wird anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach 17 Stunden werden 14 µL Acrylsäurechlorid (0.5 eq) und 23 µL Triethylamin (0.5 eq) zugegeben.

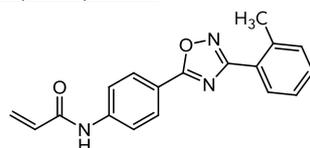
Die Reaktionsmischung wird mit ca. 75 mL Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je ca. 35 mL ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Et₂O umkristallisiert.

Ausbeute:	61 mg (51%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₂ F ₃ N ₃ O ₂ *0.5 H ₂ O

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

<i>Molmasse:</i>	359.30 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer, hygroskopischer Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL385, ST-1432
<i>R_F-Wert:</i>	0.45 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 10.62 (s, 1H -NH-), 8.39 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 4H-PhCF ₃), 8.33 (s, 1H, 1H-PhCF ₃), 8.20 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph-NH-), 8.04-7.84 (m, 4H, 2H-PhCF ₃ + 3H,5H-Ph-NH- + 3H-PhCF ₃), 6.49 (dd, 1H, ³ J = 9.8 Hz, H ₂ C=CH-), 6.33, (dd, 1H, ² J = 2.1 Hz, ³ J = 19.0 Hz, (E)-H ₂ C=CH-), 5.84, (dd, 1H, ² J = 2.1 Hz, ³ J = 9.9 Hz, (Z)-H ₂ C=CH-).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 174.0, 168.7, 163.5, 143.3, 137.4, 131.3, 131.3, 130.7, 129.6, 128.9, 127.8, 126.1, 125.5, 119.4, 117.9, 21.4.
<i>Schmelzpunkt:</i>	240 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 461.7 [M+NEt ₃] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 58.70, H 3.56, N 11.41 Gef.: C 59.05, H 3.91, N 11.21
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: m/z = 360.09544 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 360.09576 [M+H] ⁺ (Δ: 0.9 ppm)

N-(4-(3-o-tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenyl)acrylamid (ST-1427 (282))^[313]



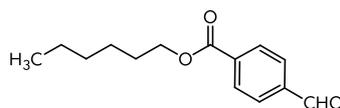
Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 95 mg 4-(3-o-Tolyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)anilin (**281**) (0.38 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. CHCl₃ und 52 µL Triethylamin (0.38 mmol, 1.0 eq) wird eine Lösung aus 5 mL abs. CHCl₃ und 32 µL Acrylsäurechlorid (0.38 mmol, 1.0 eq) zugetropft. Die Mischung wird anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt

Die Reaktionsmischung wird zweimal mit je ca. 15 mL ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus DCM:Hexan umkristallisiert.

<i>Ausbeute:</i>	69 mg (60%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₂ *0.25 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	305.33 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer, hygroskopischer Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL384, ST-1427
<i>R_F-Wert:</i>	0.41 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 10.59 (s, 1H -NH-), 8.16 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph-NH-), 8.02-7.94 (m, 3H, 3H,5H-Ph-NH- + 6H-Tolyl), 7.50-7.38 (m, 3H, 3H,4H,5H-Tolyl), 6.49 (dd, 1H, ³ J = 9.8 Hz, H ₂ C=CH-), 6.33, (dd, 1H, ² J = 2.2 Hz, ³ J = 19.1 Hz, (E)-H ₂ C=CH-), 5.84, (dd, 1H, ² J = 2.1 Hz, ³ J = 9.8 Hz, (Z)-H ₂ C=CH-).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 174.0, 168.7, 163.5, 143.3, 137.4, 131.3, 131.3, 130.7, 129.6, 128.9, 127.8, 126.1, 125.5, 119.4, 117.9, 21.4.
<i>Schmelzpunkt:</i>	190.1 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 305.8 [M+H] ⁺ , 407.2 [M+NEt ₃] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 69.78, H 5.04, N 13.56 Gef.: C 70.08, H 4.79, N 13.73
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: m/z = 306.12370 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 306.12361 [M+H] ⁺ (Δ: 0.3 ppm)

8.1.6 Synthese der S1P₅-Liganden

4-Formylbenzoesäurehexylester (**321**)^{nach[332]}

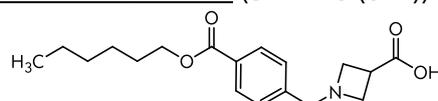


Eine Mischung aus 766 mg 4-Formylbenzoesäure (**320**) (5.10 mmol, 1.0 eq), 1.06 g Kaliumcarbonat (7.65 mmol, 1.5 eq) und 1.07 mL Bromhexan (7.65 mmol, 1.5 eq) in 10 mL abs. DMF wird 25 Stunden auf 80 °C erwärmt.

Die Reaktionsmischung wird auf ca. 75 mL Wasser gegeben und dreimal mit je ca. 75 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	1.2 g (quant.)
Summenformel:	C ₁₄ H ₁₈ O ₃
Molmasse:	234.29 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _F -Wert:	0.71 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 10.10 (s, 1H -CHO), 8.20 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-Ph-COO-), 7.95 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Ph-COO-), 4.35 (t, 2H, ³ J = 6.7 Hz, -OCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃), 1.78 (qui, 2H, ³ J ₁ = 7.8 Hz, ³ J ₂ = 6.8 Hz, -O(CH ₂) ₄ CH ₂ CH ₃), 1.48-1.31 (m, 6H, -OCH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ CH ₃), 0.91 (t, 2H, ³ J = 6.8 Hz, -O(CH ₂) ₅ CH ₃).

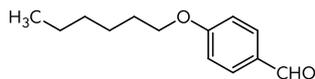
1-(4-(Hexyloxycarbonyl)benzyl)azetidin-3-carbonsäure (ST-1715 (**322**))^{nach[331]}



Eine Lösung aus 1.0 g 4-Formylbenzoesäurehexylester (**321**) (4.17 mmol, 1.0 eq), 0.43 g Azetidine-3-carbonsäure (4.27 mmol, 1.0 eq) und 2 mL Essigsäure in 125 mL Dichlorethan wird unter Argon für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 1.45 g Natriumtriacetoxyborhydrid (6.38 mmol, 1.5 eq) zugegeben und die Suspension wird für 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wird Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 75 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 125 mL CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Aceton umkristallisiert, in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

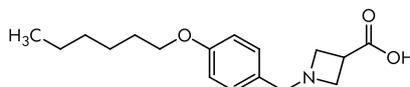
Ausbeute:	1.10 g (81%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₂₅ NO ₄ *0.25 H ₂ O
Molmasse:	319.40 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
Bezeichnung:	AL798, ST-1715
R _F -Wert:	0.44 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 10.54 (s, 1H, -COOH), 8.03 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-COO-), 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Ph-COO-), 4.30 (t, 2H, ³ J = 6.7 Hz, -O-CH ₂ -CH ₂), 4.17 (s, 2H, -Ph-CH ₂ -N), 4.10-3.93 (m, 4H, 2H,4H-Azetidin), 3.40 (s, 1H, 3H-Azetidin), 1.75 (qui, 2H, ³ J = 7.3 Hz, -O-CH ₂ -CH ₂), 1.45-1.29 (m, 6H, -O-(CH ₂) ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃), 0.90 (t, 3H, ³ J = 6.8 Hz, -CH ₂ -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 176.2, 166.1, 136.8, 131.1, 130.2, 129.4, 65.4, 59.2, 56.7, 34.6, 31.5, 28.7, 25.7, 22.6, 14.0.
ESI-MS:	m/z = 320.6 [M+H] ⁺ , 342.3 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 66.75, H 7.94, N 4.32 Gef.: C 65.92, H 7.88, N 3.97

4-(Hexyloxy)benzaldehyd (324)^{nach[332]}

Eine Mischung aus 1.74 g 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) (14.25 mmol, 1.0 eq) und 2.6 g Kaliumcarbonat (18.5 mmol, 1.3 eq) in 75 mL abs. MeCN, unter Argon, auf 80 °C erhitzt. Dann werden 2 mL Bromhexan (14.25 mmol, 1.3 eq) zugegeben die Suspension wird für 40 Stunden auf 80 °C erwärmt.

Das Lösungsmittel wird Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

<i>Ausbeute:</i>	2.87 g (98%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
<i>Molmasse:</i>	206.28 g/mol
<i>Aussehen:</i>	farbloses Öl
<i>R_f-Wert:</i>	0.64 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.86 (s, 1H -CHO), 7.85 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph-CHO), 7.11 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Ph-CHO), 4.08 (t, 2H, ³ J = 6.6 Hz, -OCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃), 1.73 (qui, 2H, ³ J ₁ = 7.8 Hz, ³ J ₂ = 5.8 Hz, -O(CH ₂) ₄ CH ₂ CH ₃), 1.45-1.27 (m, 6H, -OCH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ CH ₃), 0.88 (t, 2H, ³ J = 6.8 Hz, -O(CH ₂) ₅ CH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 207.20 [M+H] ⁺

1-(4-(Hexyloxy)benzyl)azetidin-3-carbonsäure (ST-1719 (325))^{nach[331]}

Eine Lösung aus 1.02 g 4-(Hexyloxy)benzaldehyd (**324**) (4.95 mmol, 1.0 eq), 0.50 g Azetidine-3-carbonsäure (4.95 mmol, 1.0 eq) und 2 mL Essigsäure in 125 mL Dichlorethan wird unter Argon für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 1.68 g Natriumtriacetoxyborhydrid (7.91 mmol, 1.5 eq) zugegeben und die Suspension wird für 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt

Das Lösungsmittel wird Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 75 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 125 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus EtOH/Et₂O umkristallisiert.

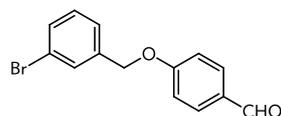
100 mg werden in 5-6M isopropanolischer HCl gelöst und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird nacheinander jeweils in MeOH, EtOH und Dichlormethan aufgenommen bzw. suspendiert. Das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

<i>Ausbeute:</i>	340 mg (24% Natriumsalz)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃ *1.25 HCl
<i>Molmasse:</i>	291.39 g/mol
<i>Aussehen:</i>	weißer Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL831, ST-1719
<i>R_f-Wert:</i>	0.02 (DCM/MeOH 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.37 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 6.94 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 4.13 (s, 2H, -Ph-CH ₂ -N), 4.01-3.88 (m, 5H, 2H,3H,4H-Azetidin), 3.15 (t, 2H, ³ J = 8.4 Hz, -O-CH ₂ -CH ₂), 1.70 (qui, 2H, ³ J = 7.3 Hz, -O-CH ₂ -CH ₂), 1.44-1.26 (m, 6H, -O-(CH ₂) ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃), 0.87 (t, 3H, ³ J = 6.8 Hz, -CH ₂ -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 172.0, 159.0, 131.2, 123.2, 114.50, 104.4, 67.4, 57.2, 54.2, 32.1, 30.8, 28.5, 25.0, 21.9, 13.8.

8.1.6 Synthese der S1P5-Liganden

ESI-MS:	$m/z = 290.0 [M-H]^-$, $326.0 [M+Cl]^-$
CHN:	Ber.: C 60.60, H 7.85, N 4.16
	Gef.: C 60.76, H 7.92, N 4.04

4-(3-Brombenzyloxy)benzaldehyd (327) ^{nach[333]}

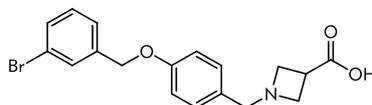


Eine Mischung aus 0.95 g 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) (7.81 mmol, 1.0 eq), 1.6 g Kaliumcarbonat (11.6 mmol, 1.3 eq) und 2.05 g 3-Brombenzylbromid (**326**) (8.20 mmol, 1.05 eq) in 40 mL abs. EtOH wird für 18 Stunden bei Raumtemperatur und für 7 Stunden bei 60 °C gerührt.

Die warme Mischung wird über Celite® filtriert und das Lösungsmittel wird Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird aus MeOH/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute:	2.12 g (92%)
Summenformel:	$C_{14}H_{11}BrO_2$
Molmasse:	291.14 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R_f -Wert:	0.59 (Hex/EE 1:1)
1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6):	$\delta = 9.88$ (s, 1H, -CHO), 7.88 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.69 (t, 1H, $^4J = 1.5$ Hz, 2H-PhBr), 7.56 (dt, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, 4H-PhBr), 7.48 (dt, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, 6H-PhBr), 7.37 (t, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, 5H-PhBr), 7.21 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, 3H,5H-PhCHO), 5.25 (s, 2H, PhBr- CH_2 -PhCHO).
ESI-MS:	$m/z = 291.04$, $293.0 [M+H]^+$

1-(4-(3-Brombenzyloxy)benzyl)azetidin-3-carbonsäure (ST-1717 (328)) ^{nach[331]}



Eine Lösung aus 0.86 g 4-(3-Brombenzyloxy)benzaldehyd (**327**) (2.94 mmol, 1.0 eq), 0.28 g Azetidine-3-carbonsäure (2.94 mmol, 1.0 eq) und 1 mL Essigsäure in 75 mL Dichlorethan wird unter Argon für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 0.95 g Natriumtriacetoxyborhydrid (4.46 mmol, 1.6 eq) zugegeben und die Suspension wird für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

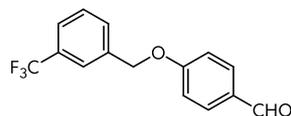
Das Lösungsmittel wird Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 75 mL $CHCl_3$ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus EtOH umkristallisiert in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Ausbeute:	530 mg (50%)
Summenformel:	$C_{18}H_{18}BrNO_3 \cdot 0.5 H_2O$
Molmasse:	376.25 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
Bezeichnung:	AL753, ST-1717
R_f -Wert:	0.07 (DCM/MeOH 4:1)
1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6):	$\delta = 7.64$ (t, 1H, $^4J = 1.5$ Hz, 2H-PhBr), 7.52 (dt, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, 4H-PhBr), 7.45 (dt, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, 6H-PhBr), 7.35 (t, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, 5H-PhBr), 7.17 (d, 2H, $^3J = 8.6$ Hz, 2H,6H-Ph CH_2), 6.93 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, 3H,5H-Ph CH_2), 5.09 (s, 2H, PhBr- CH_2 -PhCHO) 3.46 (s, 2H, -Ph- CH_2 -N), 3.37-3.30 (m, 2H, 2H,4H-Azetidin), 3.19-3.13 (m, 3H, 2H,3H,4H-Azetidin).

8. Experimenteller Teil - 8.1 Synthese der Sphingolipid-Liganden

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 174.0, 157.0, 139.9, 130.5, 130.4, 130.2, 130.0, 129.4, 126.3, 121.5, 114.4, 68.1, 61.6, 56.0, 33.4.$
Schmelzpunkt:	157 °C
ESI-MS:	$m/z = 374.3, 376.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
CHN:	Ber.: C 56.12, H 4.97, N 3.64 Gef.: C 55.93, H 4.61, N 3.46

4-(3-(Trifluormethyl)benzyloxy)benzaldehyd (**330**)^{nach[333]}

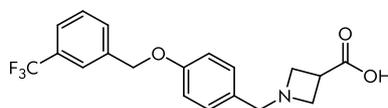


Eine Mischung aus 0.97 g 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) (8.0 mmol, 1.0 eq), 1.7 g Kaliumcarbonat (12.0 mmol, 1.5 eq) und 2.05 g 3-Trifluormethylbenzylbromid (**329**) (8.37 mmol, 1.05 eq) in 15 mL abs. DMF wird für 22 Stunden bei 60 °C unter Argon gerührt.

Die auf Raumtemperatur abgekühlte Reaktionsmischung wird auf ca. 30 mL Eiswasser gegeben und für 15 Minuten gerührt. Der entstandene Feststoff abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Ausbeute:	2.15 g (96%)
Summenformel:	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{O}_2$
Molmasse:	280.24 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R_f -Wert:	0.54 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):	$\delta = 9.88$ (s, 1H, -CHO), 7.89 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.85-7.63 (m, 4H, 2H,4H,5H,6H-PhCF ₃), 7.24 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, 3H,5H-PhCHO), 5.35 (s, 2H, PhCF ₃ -CH ₂ -PhCHO).
ESI-MS:	$m/z = 281.19$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

1-(4-(3-Trifluormethylbenzyloxy)benzyl)azetidin-3-carbonsäure (**ST-1716 (331)**)^{nach[331]}



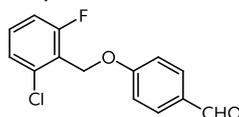
Eine Lösung aus 1.21 g 4-(3-Trifluormethylbenzyloxy)benzaldehyd (**330**) (4.32 mmol, 1.0 eq), 0.42 g Azetidine-3-carbonsäure (4.32 mmol, 1.0 eq) und 1 mL Essigsäure in 75 mL Dichlorethan wird unter Argon für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 1.39 g Natriumtriacetoxyborhydrid (6.56 mmol, 1.6 eq) zugegeben und die Suspension wird für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 100 mL CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus EtOH umkristallisiert in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Ausbeute:	895 mg (60%)
Summenformel:	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_3 \cdot 0.25 \text{H}_2\text{O}$
Molmasse:	365.35 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
Bezeichnung:	AL755, ST-1716
R_f -Wert:	0.07 (DCM/MeOH 4:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):	$\delta = 7.80$ -7.60 (m, 4H, 2H,4H,5H,6H-PhCF), 7.19 (d, 2H, $^3J = 8.6$ Hz, 2H,6H-PhCH ₂), 6.96 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, 3H,5H-PhCH ₂), 5.18 (s, 2H, PhCF ₃ -CH ₂ -PhCHO) 3.47 (s, 2H, -Ph-CH ₂ -N), 3.37-3.31 (m, 2H, 2H,4H-Azetidin), 3.20-3.13 (m, 3H, 2H,3H,4H-Azetidin).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 174.0, 157.0, 138.6, 131.4, 131.4, 130.2, 129.4, 129.4, 124.3, 124.3, 123.8, 123.7, 114.4, 68.2, 61.6, 56.0, 33.4.$
Schmelzpunkt:	119-126 °C

8.1.6 Synthese der SIP5-Liganden

ESI-MS:	m/z = 364.4 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 61.70, H 5.04, N 3.69
	Gef.: C 61.62, H 4.80, N 3.56

4-(2-Chlor-6-fluorbenzyloxy)benzaldehyd (333) ^{nach^[333]}

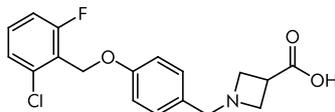


Eine Mischung aus 1.50 g 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) (12.28 mmol, 1.0 eq), 2.5 g Kaliumcarbonat (18 mmol, 1.5 eq) und 2.31 g 1-Chlor-2-(chloromethyl)-3-fluorbenzol (**332**) (12.1 mmol, 1.05 eq) in 15 mL abs. DMF wird für 23 Stunden, unter Argon, bei 60 °C gerührt.

Die auf Raumtemperatur abgekühlte Reaktionsmischung wird auf ca. 30 mL Eiswasser gegeben und für 15 Minuten gerührt. Der entstandene Feststoff abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Ausbeute:	3.18 g (98%)
Summenformel:	C ₁₄ H ₁₀ ClFO ₂
Molmasse:	264.68 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.56 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.90 (s, 1H, -CHO), 7.90 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.59-7.31 (m, 3H, 3H,4H,5H-Ph), 7.26 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhCHO), 5.28 (d, 2H, ⁴ J = 1.8 Hz, Ph-CH ₂ -PhCHO).
ESI-MS:	m/z = 265.3 [M+H] ⁺

1-(4-(2-Chlor-6-fluorbenzyloxy)benzyl)azetidin-3-carbonsäure (ST-1718 (334)) ^{nach^[331]}



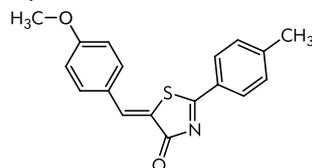
Eine Lösung aus 1.36 g 4-(2-Chlor-6-fluorbenzyloxy)benzaldehyd (**333**) (4.95 mmol, 1.0 eq), 0.50 g Azetidine-3-carbonsäure (4.95 mmol, 1.0 eq) und 1 mL Essigsäure in 75 mL Dichlorethan wird unter Argon für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 1.47 g Natriumtriacetoxyborhydrid (6.92 mmol, 1.4 eq) zugegeben und die Suspension wird für 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL Wasser und 100 mL Ethylacetat suspendiert. Die organische Phase wird abgetrennt und verworfen. Die feststoffhaltige, wässrige Phase wird gesaugt und mit Wasser nachgewaschen. Das Rohprodukt in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Ausbeute:	1.21 mg (70%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₇ ClFNO ₃ •0.75 H ₂ O
Molmasse:	349.78 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
Bezeichnung:	AL751, ST-1718
R _f -Wert:	0.37 (DCM/MeOH 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆ + d ₁ -TFA):	δ = 10.23 (br s, 1H, -COOH), 7.56-7.48 (m, 1H, 5H-Ph), 7.42 (pd, 3H, 3H-Ph + 2H,6H-PhCH ₂), 7.35-7.29 (m, 1H, 4H-Ph), 7.12 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhCH ₂), 5.16 (d, 2H, ⁴ J = 1.6 Hz, PhBr-CH ₂ -PhCHO), 4.31 (s, 2H, -Ph-CH ₂ -N), 3.23-3.13 (m, 3H, 2H,4H-Azetidin), 3.66-3.55 (m, 1H, 3H-Azetidin).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 171.4, 159.1, 158.6, 158.0, 135.5, 131.7, 125.8, 122.9, 121.9, 121.6, 117.6, 115.0, 61.0, 56.7, 54.7, 32.0.
Schmelzpunkt:	162 °C
ESI-MS:	m/z = 350.10 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 59.51, H 5.13, N 3.86
	Gef.: C 59.49, H 4.94, N 3.72

8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

8.2.1 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion

C06: (Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (182)



Methode 1:

Eine Mischung aus 505 mg *p*-Tolunitril (**337**) (4.31 mmol, 1.0 eq), 0.52 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (4.31 mmol, 1.0 eq), 0.3 mL Thioglykolsäure (**335**) (4.31 mmol, 1.0 eq) und 0.5 mL Triethylamin (3.61 mmol, 0.84 eq) wird für 15 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Die gelb-grünliche zähflüssige Lösung wird mit ca. 7 mL MeOH in einen Kolben gespült und das Lösemittel bis auf ca. 5 mL eingengt. Dabei entsteht ein orangener Feststoff, der absaugen und mit MeOH waschen wird. Aus dem Filtrat fällt beim Stehen weiteres Produkt aus.

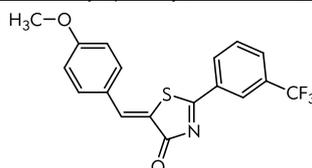
Methode 2:

Eine Mischung aus 505 mg *p*-Tolunitril (**337**) (4.31 mmol, 1.0 eq), 0.52 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (4.31 mmol, 1.0 eq), 458 mg Thioglykolsäuremethylester (**338**) (4.31 mmol, 1.0 eq) und 0.5 mL Triethylamin (3.61 mmol, 0.84 eq) wird für 15 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Die feste, gelb-orangene Masse wird mit ca. 5 mL MeOH verdünnt, und der orangene Feststoff wird abgesaugt und mit MeOH gewaschen. Aus dem Filtrat fällt beim Stehen weiteres Produkt aus.

<i>Ausbeute:</i>	<i>Methode 1:</i> 431 mg (32%) <i>Methode 2:</i> 936 mg (70%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₁₅ NO ₂ S
<i>Molmasse:</i>	309.38 g/mol
<i>Aussehen:</i>	orangener Feststoff
<i>R_F-Wert:</i>	0.62 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 8.11 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Tolyl), 8.01 (s, 1H, -CH-), 7.65 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.36 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.02 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.89 (s, 3H, -OCH ₃), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 309.8 [M+H] ⁺

(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(3-(trifluormethyl)phenyl)thiazol-4(5H)-on (ST-1696 (374))



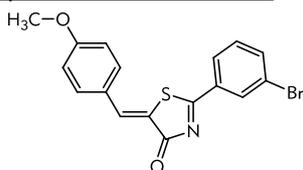
Eine Mischung aus 0.56 mL 3-Trifluormethylbenzonitril (**371**) (4.18 mmol, 1.0 eq), 0.51 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (4.18 mmol, 1.0 eq), 0.29 mL Thioglykolsäure (**335**) (4.18 mmol, 1.0 eq) und 0.58 mL Triethylamin (4.18 mmol, 1.0 eq) wird für 15 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Die grünliche Mischung wird mit MeOH in einen Kolben überführt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird in etwas Aceton erwärmt und solange Wasser zugegeben bis sich ein orangener Feststoff bildet. Der Feststoff wird abgesaugt und mit wenig Wasser/Aceton nachgewaschen. Aus dem Filtrat wird weiteres Produkt auskristallisiert.

8.2.1 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion

Ausbeute:	931 mg (61%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₂ F ₃ NO ₂ S*0.25 H ₂ O
Molmasse:	363.35 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL681, ST-1696
R _F -Wert:	0.36 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.49 (d, 1H, ³ J = 7.9 Hz, 4H-PhCF ₃), 8.42 (s, 1H, 2H-PhCF ₃), 8.18 (d, 1H, ³ J = 7.9 Hz, 6H-PhCF ₃), 8.06 (s, 1H, -CH-), 7.92 (t, 1H, ³ J = 7.9 Hz, 5H-PhCF ₃), 7.82 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.16 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.87 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 185.0, 183.0, 162.4, 139.9, 133.1, 132.8, 131.6, 131.0, 131.0, 129.9, 126.3, 125.5, 125.4, 123.0, 115.0, 55.6.
ESI-MS:	m/z = 364.6 [M+H] ⁺ , 386.7 [M+Na] ⁺ , 749.9 [M+Na] ²⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 364.06136 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 364.06158 [M+H] ⁺ (Δ: 0.6 ppm)
CHN:	Ber.: C 58.77, H 3.43, N 3.81, S 8.72 Gef.: C 58.47, H 3.46, N 3.76, S 8.87

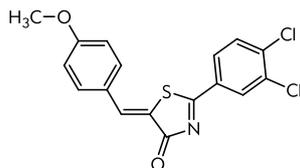
(Z)-2-(3-Bromphenyl)-5-(4-methoxybenzyliden)thiazol-4(5H)-on (ST-1697 (375))



Eine Mischung aus 785 mg 3-Brombenzonitril (**372**) (4.32 mmol, 1.0 eq), 0.53 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (4.32 mmol, 1.0 eq), 0.30 mL Thioglykolsäure (**335**) (4.32 mmol, 1.0 eq) und 0.60 mL Triethylamin (4.32 mmol, 1.0 eq) wird für 15 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Die Mischung wird mit MeOH in einen Kolben überführt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird in etwas Aceton erwärmt und solange Wasser zugegeben bis sich ein orangener Feststoff bildet. Der Feststoff wird abgesaugt und mit wenig Wasser/Aceton nachgewaschen.

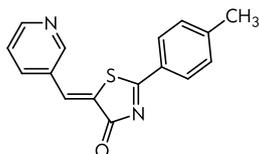
Ausbeute:	755 mg (47%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₂ BrNO ₂ S*0.3 H ₂ O
Molmasse:	374.25 g/mol
Aussehen:	orange-gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL685, ST-1697
R _F -Wert:	0.55 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.36 (t, 1H, ⁴ J = 1.8 Hz, 2H-PhBr), 8.14-8.11 (m, 1H, 6H-PhBr), 8.05 (s, 1H, -CH-), 7.82-7.78 (d, 1H, 3H-PhBr), 7.65 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.44 (t, 1H, ³ J = 8.0 Hz, 5H-PhBr), 7.03 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.90 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 184.9, 182.9, 162.3, 139.4, 137.4, 133.9, 132.9, 131.4, 130.6, 127.1, 126.4, 123.4, 123.3, 115.0, 55.6.
ESI-MS:	m/z = 374.09, 376.06 [M+H] ⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 373.98449 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 373.98520 [M+H] ⁺ (Δ: 1.9 ppm)
CHN:	Ber.: C 53.78, H 3.35, N 3.69, S 8.45 Gef.: C 53.48, H 3.24, N 3.64, S 8.65

(Z)-2-(3,4-Dichlorphenyl)-5-(4-methoxybenzyliden)thiazol-4(5H)-on (ST-1698 (376))

Eine Mischung aus 742 mg 3,4-Dichlorbenzonitril (**373**) (4.32 mmol, 1.0 eq), 0.53 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (4.32 mmol, 1.0 eq), 0.30 mL Thioglykolsäure (**335**) (4.32 mmol, 1.0 eq) und 0.60 mL Triethylamin (4.32 mmol, 1.0 eq) wird für 15 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Die Mischung wird mit Aceton in einen Kolben überführt und ein Großteil des Lösemittels wird im Vakuum entfernt. Dann wird solange Wasser zugegeben bis sich ein orangener Feststoff bildet. Der Feststoff wird abgesaugt und mit wenig Wasser/Aceton nachgewaschen. Das Rohprodukt wird aus MeOH umkristallisiert.

<i>Ausbeute:</i>	755 mg (47%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₇ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ S*0.25 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	364.25 g/mol
<i>Aussehen:</i>	orangener Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL691, ST-1698
<i>R_F-Wert:</i>	0.60 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.30 (s, 1H, ⁴ J = 2.1 Hz, 2H-PhCl ₂), 8.06 (s, 1H, -CH-), 8.02 (dd, 1H, ⁴ J = 2.1 Hz, ³ J = 8.4 Hz, 6H-PhCl ₂), 7.66-7.61 (m, 3H, 5H-PhBr + 2H, 6H-PhOMe), 7.02 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H, 5H-PhOMe), 3.90 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 184.0, 182.8, 162.5, 139.8, 139.3, 134.1, 133.0, 131.8, 131.3, 130.2, 127.4, 126.3, 123.2, 115.0, 55.6.
<i>Schmelzpunkt:</i>	213.8 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 366.11 [M+H] ⁺
<i>MALDI-HRMS:</i>	Ber.: m/z = 363.99603 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 363.99659 [M+H] ⁺ (Δ: 1.5 ppm)
<i>CHN:</i>	Ber.: C 55.27, H 3.14, N 3.80, S 8.70 Gef.: C 55.31, H 3.00, N 3.89, S 9.46

(Z)-5-(Pyridin-3-ylmethyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1629 (377))

Eine Mischung aus 500 mg p-Tolunitril (**337**) (4.27 mmol, 1.0 eq), 0.4 mL g frisch destilliertes 3-Pyridincarbaldehyd (4.27 mmol, 1.0 eq), 0.3 mL Thioglykolsäure (**335**) (4.27 mmol, 1.0 eq) und 0.5 mL Triethylamin (3.61 mmol, 0.85 eq) wird für 30 min in der Mikrowelle auf 100 °C erwärmt.

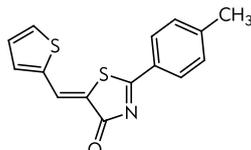
Die rötliche zähflüssige Mischung wird mit MeOH in einen Kolben überführt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Aceton suspendiert, abgesaugt und mit etwas Aceton und Et₂O nachgewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und MeOH (98:2) aufgereinigt.

<i>Ausbeute:</i>	159 mg (13%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ OS
<i>Molmasse:</i>	280.34 g/mol
<i>Aussehen:</i>	hellgelber Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL519, ST-1629
<i>R_F-Wert:</i>	0.19 (DCM/MeOH 98:2)

8.2.1 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 8.92$ (d, 1H, $^4J = 2.0$ Hz, 2H-Py), 8.67 (dd, 1H, $^4J = 1.2$ Hz, $^3J = 4.7$ Hz, 6H-Py), 8.11 (d, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 3H,5H-Tolyl), 8.00-7.96 (m, 2H, -CH- + 4H-Py), 7.46 (dd, 2H, $^3J = 4.7$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, 5H-Py), 7.38 (d, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 2.49 (s, 3H, - CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 186.9, 182.8, 151.7, 151.0, 147.2, 136.5, 133.7, 130.1, 130.0, 129.1, 129.0, 129.0, 124.0, 22.0$.
Schmelzpunkt:	214.6 °C
ESI-MS:	$m/z = 281.16$ [M+H] ⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: $m/z = 281.07431$ [M+H] ⁺ Gef.: $m/z = 281.07546$ [M+H] ⁺ (Δ : 4.0 ppm)

(Z)-5-(Thiophen-2-ylmethyl)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1740 (378))

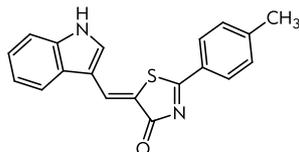


Eine Mischung aus 313 mg *p*-Tolunitril (**337**) (2.68 mmol, 1.0 eq), 0.25 mL Thiophen-2-carbaldehyd (2.68 mmol, 1.0 eq), 0.19 mL Thioglykolsäure (**335**) (2.68 mmol, 1.0 eq) und 0.37 mL Triethylamin (2.68 mmol, 1.0 eq) wird zweimal für 15 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Die rötliche Mischung wird in Aceton erhitzt und bis zur Trübung Wasser zugegeben. Der entstehende Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Wasser/Aceton nachgewaschen.

Ausbeute:	130 mg (17%)
Summenformel:	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NOS}_2 \cdot 0.2 \text{H}_2\text{O}$
Molmasse:	285.38 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL732, ST-1740
R_f -Wert:	0.44 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 8.19$ (s, 1H, -CH-), 8.11 (d, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 3H,5H-Thiophen), 7.70-7.67 (m, 1H, 5H-Thiophen), 7.51-7.50 (m, 1H, 3H-Thiophen), 7.36 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, 2H,6H-Toyl), 7.23-7.20 (m, 1H, 4H-Thiophen), 2.48 (s, 3H, - CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 182.9, 181.9, 145.7, 136.6, 130.5, 130.1, 130.0, 128.9, 128.1, 126.7, 123.3, 121.5, 119.4, 118.5, 112.5, 111.8, 21.3$.
Schmelzpunkt:	209 °C (Sublimation)
ESI-MS:	$m/z = 319.4$ [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 70.78, H 4.51, N 8.70, S 9.96 Gef.: C 70.94, H 4.19, N 8.69, S 10.51
MALDI-HRMS:	Ber.: $m/z = 319.08996$ [M+H] ⁺ Gef.: $m/z = 319.09048$ [M+H] ⁺ (Δ : 1.6 ppm)

(Z)-5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1702 (379))



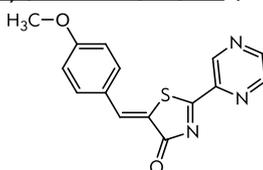
Eine Mischung aus 843 mg *p*-Tolunitril (**337**) (7.19 mmol, 1.0 eq), 1044 mg 3-Indolcarbaldehyd (7.19 mmol, 1.0 eq), 0.5 mL Thioglykolsäure (**335**) (7.19 mmol, 1.0 eq) und 1 mL Triethylamin (7.19 mmol, 1.0 eq) wird für 15 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Die rötliche Mischung wird aus Wasser/EtOH umkristallisiert und mit etwas Et_2O nachgewaschen. Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Ausbeute:	155 mg (7%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₄ N ₂ OS*0.2 H ₂ O
Molmasse:	318.39 g/mol
Aussehen:	dunkelroter Feststoff
Bezeichnung:	AL719, ST-1702
R _F -Wert:	0.44 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 12.41 (br s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, 3H-Indol), 8.11-8.07 (m, 3H, 3H,5H-Tolyl + -CH-), 8.00-7.97 (m, 1H, 4H-Indol), 7.56-7.53 (m, 1H, 7H-Indol), 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Toyl), 7.32-7.21 (m, 2H, 5H,6H-Indol), 2.45 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 182.9, 181.9, 145.7, 136.6, 130.5, 130.1, 130.0, 128.9, 128.1, 126.7, 123.3, 121.5, 119.4, 118.5, 112.5, 111.8, 21.3.
Schmelzpunkt:	286.1 °C
ESI-MS:	m/z = 319.4 [M+H] ⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 319.08996 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 319.09048 [M+H] ⁺ (Δ: 1.6 ppm)
CHN:	Ber.: C 70.78, H 4.51, N 8.70, S 9.96 Gef.: C 70.94, H 4.19, N 8.69, S 10.51

(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(pyrazin-2-yl)thiazol-4(5H)-on (ST-1755 (384))



Zu einer Mischung aus 866 mg Pyrazin-2-carbonitril (8.24 mmol, 1.0 eq), 1122 mg 4-Methoxybenzaldehyde (**336**) (8.24 mmol, 1.0 eq), 1.1 mL Triethylamin (8.24 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. MeOH werden 875 mg Thioglykolsäuremethylester (**338**) (8.24 mmol, 1.0 eq) gegeben und für 5 min bei 90 °C in die Mikrowelle gegeben.

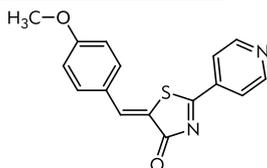
Der schwarze Rückstand wird in ca. 70 mL Dichlormethan gelöst und über Kieselgel filtriert und mit ca. 150 mL Dichlormethan nachgespült. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt.

Der orangene Rückstand wird aus EtOH umkristallisiert, in Et₂O suspendiert, abgesaugt und schließlich in Dichlormethan gelöst und filtriert.

Ausbeute:	120 mg (5%)
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₂ S
Molmasse:	297.33 g/mol
Aussehen:	orange-roter Feststoff
Bezeichnung:	AL834, ST-1755
R _F -Wert:	0.23 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.46 (d, 1H, ⁴ J = 1.4 Hz, 3H-Pyrazin), 9.04 (d, 1H, ³ J = 2.4 Hz, 6H-Pyrazin), 8.96 (dd, 1H, ⁴ J = 1.5 Hz, ³ J = 2.3 Hz, 5H-Pyrazin), 8.08 (s, 1H, -CH-), 7.84 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.16 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.87 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 186.0, 182.2, 162.1, 149.7, 145.2, 143.5, 143.3, 139.7, 133.2, 125.8, 123.0, 115.1, 55.9, 18.4.
Schmelzpunkt:	216 °C
ESI-MS:	m/z = 298.3 [M+H] ⁺ , 320.3 [M+Na] ⁺ , 617.2 [M+Na] ²⁺
CHN:	Ber.: C 60.59, H 3.73, N 14.13, S 10.78 Gef.: C 60.49, H 3.87, N 13.79, S 10.68

8.2.1 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Drei-Komponenten-one-pot-Reaktion

(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(pyridin-4-yl)thiazol-4(5H)-on (ST-1641 (385))

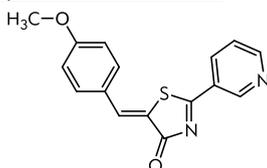


Eine Mischung aus 525 mg 4-Pyridinnitril (5.04 mmol, 1.0 eq), 0.6 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (5.04 mmol, 1.0 eq), 0.35 mL Thioglykolsäure (**335**) (5.04 mmol, 1.0 eq) und 0.5 mL Triethylamin (3.61 mmol, 0.7 eq) wird für 30 min in der Mikrowelle auf 100 °C erwärmt.

Das Lösungsmittel der schwarzen, zähflüssigen Mischung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird EtOH/Et₂O, aus EtOH und anschließend aus Chloroform/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute:	86 mg (6%)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂ S
Molmasse:	296.34 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL581, ST-1641
R _F -Wert:	0.61 (DCM/MeOH 9:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.89 (d, 2H, ³ J = 6.2 Hz, 2H,6H-Py), 8.11 (s, 1H, -CH-), 7.99 (d, 2H, ³ J = 6.1 Hz, 3H,5H-Py), 7.67 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PHOMe), 7.05 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.91 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 187.3, 182.6, 162.7, 150.5, 141.0, 139.3, 133.2, 126.2, 122.6, 121.5, 115.1, 55.6.
Schmelzpunkt:	237.8 °C
ESI-MS:	m/z = 297.80 [M+H] ⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 297.06922 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 297.06936 [M+H] ⁺ (Δ: 0.5 ppm)

(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(pyridin-3-yl)thiazol-4(5H)-on (ST-1638 (386))



Eine Mischung aus 525 mg 3-Cyanopyridin (5.04 mmol, 1.0 eq), 0.6 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (5.04 mmol, 1.0 eq), 0.35 mL Thioglykolsäure (**335**) (5.04 mmol, 1.0 eq) und 0.7 mL Triethylamin (5.04 mmol, 1.00 eq) wird für 15 min in der Mikrowelle auf 100 °C erwärmt.

Das Lösungsmittel der schwarzen, zähflüssigen Mischung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus MeOH umkristallisiert.

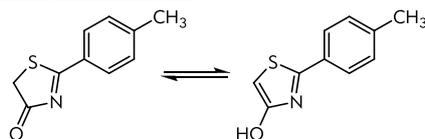
Ausbeute:	796 mg (53%)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂ S
Molmasse:	296.34 g/mol
Aussehen:	sonnengelber Feststoff
Bezeichnung:	AL577, ST-1638
R _F -Wert:	0.12 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.37 (d, 1H, ⁴ J = 1.6 Hz, 2H-Py), 8.88 (dd, 1H, ⁴ J = 1.4 Hz, ³ J = 4.8 Hz, 6H-Py), 8.53-8.48 (m, 1H, 4H-Py), 8.08 (s, 1H, -CH-), 7.66 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.56-7.51 (m, 1H, 5H-Py), 7.05 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.90 (s, 3H, -OCH ₃).

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 183.8, 182.6, 162.5, 154.6, 154.6, 149.1, 140.0, 135.9, 133.0, 126.2, 122.7, 115.0, 105.0, 55.6.
Schmelzpunkt:	237.7 °C
ESI-MS:	m/z = 297.1 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 64.85, H 4.08, N 9.45, S 10.82 Gef.: C 64.87, H 4.03, N 9.35, S 10.87

8.2.2 Synthese von Thiazol-4(5H)-one bzw. Vorstufen

2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on bzw. 2-p-Tolylthiazol-4-ol (339)



Method 1:^[336]

Eine Lösung aus 1.87 g *p*-Tolunitril (**337**) (14.10 mmol, 1.0 eq), 1.41 mL Triethylamin (10.10 mmol, 0.72 eq) und 1 mL Thioglykolsäure (**335**) (14.10 mmol, 1.0 eq) in 35 mL abs. EtOH wird für 2 Stunde zum Sieden erhitzt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die gelb-grünliche Mischung wird mit ca. 2 mL MeOH verdünnt und im Kühlschrank stehen gelassen. Nach ca. 3-4 Tagen kann ausgefallenen Produkt abgesaugt und mit MeOH gewaschen werden. Das Filtrat wird aufkonzentriert und erneut für ca. eine Woche im Kühlschrank stehen gelassen. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden.

Method 2:

Zu einer Lösung aus 843 g *p*-Tolunitril (**337**) (7.05 mmol, 1.0 eq) und 1.0 mL Triethylamin (7.0 mmol, 1.0 eq) werden 0.5 mL Thioglykolsäure (**335**) (7.05 mmol, 1.0 eq) gegeben und Mischung für 15 min bei 100 °C in die Mikrowelle gegeben.

Das Lösungsmittel der gelb-grünliche Mischung wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in ca. 10 mL MeOH aufgenommen und im Kühlschrank stehen gelassen. Nach ca. 3-4 Tagen wird ausgefallenes Produkt abgesaugt und mit MeOH nachgewaschen. Das Filtrat wird aufkonzentriert und erneut für ca. eine Woche im Kühlschrank stehen gelassen. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden.

Method 3:

Zu einer Lösung aus 648 g *p*-Tolunitril (**337**) (5.84 mmol, 1.0 eq) und 0.8 mL Triethylamin (5.8 mmol, 1.0 eq) werden 620 mg Thioglykolsäuremethylester (**338**) (5.84 mmol, 1.0 eq) gegeben und Mischung für 15 min bei 100 °C in die Mikrowelle gegeben.

Das Lösungsmittel der schwarzen Mischung wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in ca. 5 mL MeOH aufgenommen und im Kühlschrank stehen gelassen. Nach ca. 5-6 Tagen wird ausgefallenes Produkt abgesaugt und mit MeOH nachgewaschen. Das Filtrat wird aufkonzentriert und erneut für ca. eine Woche im Kühlschrank stehen gelassen. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden.

Method 4: ^{nach[344]}

Zu einer gelben 0 °C kalten Lösung aus 250 mg 4-Methylbenzothioamid (**340**) (1.65 mmol, 1.0 eq) in 7 mL Dichlormethan und 3.5 mL ges. NaHCO₃-Lösung werden tropfenweise 144 µL Bromacetyl bromid (**341**) zugegeben. Die brauche Mischung wird für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die wässrige Phase wird abgetrennt und zweimal mit je ca. 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ca. 30 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wird aus MeOH umkristallisiert.

Method 5: ^{nach[337]}

Eine Gemisch aus 110 mg 4-Methylbenzothioamid (**340**) (0.65 mmol, 1.0 eq) und 63 mg Chloressigsäure (**342**) (0.65 mmol, 1.0 eq) wird bei 150 °C geschmolzen und für 15 min bei dieser Temperatur gehalten.

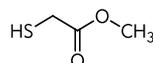
Nach abkühlen auf Raumtemperatur wird der Feststoff in ca. 20 mL Wasser suspendiert und dreimal mit je ca. 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wird aus MeOH umkristallisiert. Ebenfalls entstehendes 2,2'-di-*p*-Tolyl-4,5'-bithiazol-4'-ol (Dimer) kann durch Umkristallisieren nicht abgetrennt werden.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

<i>Ausbeute:</i>	<u>Methode 1:</u> 581 mg (22%) <u>Methode 2:</u> 456 mg (34%) <u>Methode 3:</u> 156 mg (14%) <u>Methode 4:</u> 100 mg (32%) <u>Methode 5:</u> 41 mg (16% bezogen auf 326)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₀ H ₉ NOS
<i>Molmasse:</i>	191.25 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelber, blättriger oder hellgelber pulveriger Feststoff
<i>R_f-Wert:</i>	0.41 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 11.00 (s, 1H, -OH), 9.54 (s, 1H, -C=CH-), 7.66 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl _{Keton}), 7.40 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-Tolyl _{Keton}), 7.25 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Tolyl _{Enol}), 7.19 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl _{Enol}), 3.78 (d, 1H, ³ J = 15.3 Hz, -CH ₂ -), 3.65 (d, 1H, ³ J = 15.3 Hz, -CH ₂ -), 2.33 (s, 3H, -CH ₃), 2.31 (s, 3H, -CH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 191.6 [M+H] ⁺

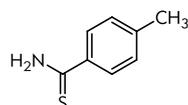
Thioglykolsäuremethylester (338) ^{nach[342]}



Eine Mischung aus 5.0 mL mg Thioglykolsäure (**335**) (71.92 mmol, 1.0 eq), 4.61 mL konz. Schwefelsäure (86.30 mmol, 1.2 eq) in 10 mL MeOH wird für 15 min bei 100 °C in der Mikrowelle erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 100 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 75 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

<i>Ausbeute:</i>	6.83 g (89%)
<i>Summenformel:</i>	C ₃ H ₆ O ₂ S
<i>Molmasse:</i>	106.14 g/mol
<i>Aussehen:</i>	farbloses, stark riechendes Öl
<i>R_f-Wert:</i>	0.57 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 3.75 (s, 3H, -OCH ₃), 3.27 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, -CH ₂ -), 2.00 (t, 1H, ³ J = 8.3 Hz, -SH).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 104.7 [M-H] ⁻

4-Methylbenzothioamid (340) ^[343]

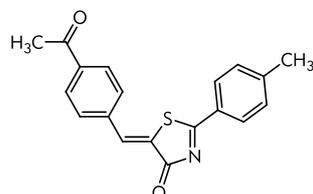


Eine Lösung aus 5.04 g *p*-Tolunitril (**337**) (43.06 mmol, 1.0 eq), 5 mL 40-48%ig Ammoniumsulfid Lösung in Wasser (43 mmol, 1 eq) und 15 mL MeOH wird für 25 min bei 80 °C in die Mikrowelle erwärmt. Die beim Abkühlen festgewordenen Mischung wird mit ca. 5 mL kaltem MeOH aufgeschlämmt. Die Kristallsuspension wird abgenutscht, und mit wenig MeOH nachgewaschen.

<i>Ausbeute:</i>	2.74 g (42%)
<i>Summenformel:</i>	C ₈ H ₉ NS
<i>Molmasse:</i>	155.23 g/mol
<i>Aussehen:</i>	hellgelber, kristalliner Feststoff
<i>R_f-Wert:</i>	0.47 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 9.76 (br s, 1H, -NH ₂), 9.40 (br s, 1H, -NH ₂), 7.82 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-Ph), 7.21 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Ph), 2.33 (s, 3H, -CH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 151.9 [M+H] ⁺

8.2.3 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Kondensation mit Thiazol-4(5H)-onen

(Z)-5-(4-Acetylbenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1699 (344))

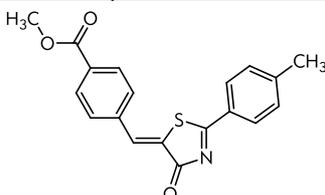


Eine Suspension aus 150 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.78 mmol, 1.0 eq), 116 mg 4-Acetylbenzaldehyd (0.52 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 3 min in der Mikrowelle auf 90 °C erhitzt.

Die gelblich-grüne Suspension wird abgesaugt und der gelbe Feststoff mit etwas MeOH nachgewaschen.

Ausbeute:	186 mg (74%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₅ NO ₂ S*0.1 H ₂ O
Molmasse:	321.39 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL688, ST-1699
R _F -Wert:	0.44 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.12 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Tolyl), 8.07 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 2H,6H-PhAc), 8.04 (s, 1H, -CH-), 7.75 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-PhAc), 7.39 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 2.65 (s, 3H, -C(O)CH ₃), 2.49 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 197.0, 187.1, 183.0, 147.1, 138.1, 138.1, 135.9, 130.5, 130.1, 129.2, 129.1, 129.0, 129.0, 26.7, 22.0.
Schmelzpunkt:	234 °C
ESI-MS:	m/z = 322.19 [M+H] ⁺ , 344.18 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 70.61, H 4.74, N 4.33, S 9.92 Gef.: C 70.50, H 4.60, N 4.29, S 10.11
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 322.08963 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 322.09062 [M+H] ⁺ (Δ: 3.0 ppm)

(Z)-4-((4-Oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)benzoesäuremethylester (ST-1685 (345))



Eine Suspension aus 150 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.78 mmol, 1.0 eq), 116 mg 4-Formylbenzoesäuremethylester (0.78 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 10 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

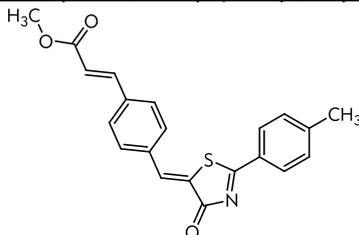
Die gelblich-grüne Suspension wird abgesaugt und der gelbe Feststoff mit etwas MeOH nachgewaschen.

Ausbeute:	194 mg (73%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₅ NO ₂ S
Molmasse:	337.39 g/mol
Aussehen:	hellgelber Feststoff
Bezeichnung:	AL602, ST-1685
R _F -Wert:	0.52 (Hex/EE 1:1)

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.15-8.07 (m, 4H, 3H,5H-Tolyl + 2H,6H-PhCOOCH ₃), 8.07 (s, 1H, -CH-), 7.94 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-PhCOOCH ₃), 7.52 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 3.90 (s, 3H, -COOCH ₃), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 186.6, 182.0, 165.5, 147.2, 137.8, 135.6, 131.1, 130.6, 130.3, 129.9, 128.8, 128.8, 128.8, 128.4, 52.4, 21.5.
Schmelzpunkt:	215 °C
ESI-MS:	m/z = 338.0 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 67.64, H 4.48, N 4.15, S 9.50 Gef.: C 67.59, H 4.47, N 3.99, S 9.50

(E)-3-(4-((Z)-(4-oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)phenyl)acrylsäuremethylester (ST-1689 (346))

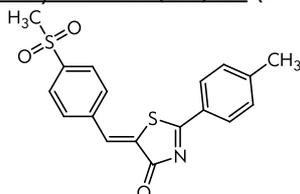


Eine Suspension aus 75 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.39 mmol, 1.0 eq), 75 mg (E)-3-(4-Formylphenyl)acrylsäuremethylester (**354**) (0.39 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 1.5 mL abs. MeOH wird für 10 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Der gelbliche Feststoff wird in ca. 2 mL MeOH suspendiert, abgesaugt und mit etwas MeOH nachgewaschen.

Ausbeute:	186 mg (82%)
Summenformel:	C ₂₁ H ₁₇ NO ₃ S
Molmasse:	337.39 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL652, ST-1689
R _F -Wert:	0.58 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.15 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 8.04 (s, 1H, -CH-), 7.94 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 2H,6H-PhCH=CHCOOCH ₃), 7.85 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 3H,5H-PhCH=CHCOOCH ₃), 7.73 (d, 1H, ³ J = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-), 7.51 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Tolyl), 6.80 (d, 1H, ³ J = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-), 3.75 (s, 3H, -COOCH ₃), 2.46 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 186.2, 182.1, 166.4, 147.0, 136.4, 136.3, 136.3, 135.1, 131.0, 130.3, 129.2, 128.8, 128.5, 127.2, 119.9, 51.6, 21.5.
Schmelzpunkt:	223 °C
ESI-MS:	m/z = 364.22 [M+H] ⁺ , 386.23 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 69.40, H 4.71, N 3.85, S 8.82 Gef.: C 69.08, H 4.73, N 3.72, S 8.76

(Z)-5-(4-(Methylsulfonyl)benzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1634 (347))



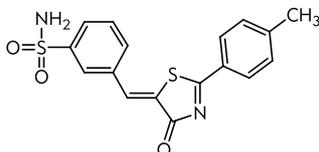
Eine Suspension aus 100 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.52 mmol, 1.0 eq), 96 mg 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd (0.52 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 20 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Die schwarze Suspension wird abgesaugt und der gelbe Feststoff mit etwas MeOH nachgewaschen.

8.2.3 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Kondensation mit Thiazol-4(5H)-onen

Ausbeute:	115 mg (62%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃ S ₂
Molmasse:	357.45 g/mol
Aussehen:	hellgelber, feinpulvriger Feststoff
Bezeichnung:	AL548, ST-1634
R _F -Wert:	0.36 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.15-8.03 (m, 7H, 3H,5H-Tolyl + -CH- + 2H,6H-PhSO ₂ CH ₃ + 3H,5H-PhSO ₂ CH ₃), 7.52 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 3.30 (s, 3H, -SO ₂ CH ₃), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 186.7, 181.9, 147.3, 142.0, 138.2, 135.0, 131.0, 130.3, 129.7, 128.8, 128.4, 127.8, 43.3, 21.5.
Schmelzpunkt:	269.0 °C
ESI-MS:	m/z = 358.52 [M+H] ⁺ , 380.52 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 60.48, H 4.23, N 3.92, S 17.94 Gef.: C 60.34, H 4.28, N 3.88, S 17.83

(Z)-3-((4-Oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)benzolsulfonamid (ST-1742 (348))

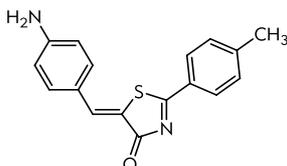


Eine Suspension aus 150 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.81 mmol, 1.0 eq), 155 mg 3-Formylbenzolsulfonamid (**359**) (0.81 mmol, 1.0 eq) und 4 Tropfen Piperidin in 3 mL abs. MeOH wird für 5 min in der Mikrowelle auf 90 °C erhitzt.

Die schwarze Suspension wird abgesaugt und mit etwas MeOH nachgewaschen.

Ausbeute:	156 mg (54%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S ₂
Molmasse:	358.44 g/mol
Aussehen:	dunkelgelber Feststoff
Bezeichnung:	AL740, ST-1742
R _F -Wert:	0.21 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.21 (s, 1H, 2H-PhSO ₂ NH ₂), 8.12 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Tolyl), 8.09 (s, 1H, -CH-), 8.04-7.95 (m, 2H, 4H,6H-PhSO ₂ NH ₂), 7.79 (t, 1H, ³ J = 7.8 Hz, 5H-PhSO ₂ NH ₂), 7.57 (s, 2H, -SO ₂ NH ₂), 7.52 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 2.46 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 186.3, 181.8, 147.0, 145.1, 135.5, 134.1, 133.5, 130.2, 130.1, 128.6, 128.3, 128.0, 127.6, 126.4, 21.4.
Schmelzpunkt:	244 °C (Sublimation)
ESI-MS:	m/z = 357.3 [M-H] ⁻
CHN:	Ber.: C 56.96, H 3.94, N 7.82, S 17.89 Gef.: C 57.00, H 4.03, N 7.67, S 17.88

(Z)-5-(4-Aminobenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1498 (349))



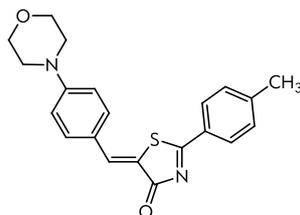
Eine Suspension aus 110 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.58 mmol, 1.0 eq), 70 mg 4-Aminobenzaldehyd (**352**) (0.58 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2.5 mL abs. MeOH wird für 15 min und 5 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Die blutrote Suspension wird abgesaugt und der Feststoff mit etwas MeOH nachgewaschen.

Ausbeute:	124 mg (73%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ OS
Molmasse:	294.37 g/mol
Aussehen:	dunkelroter Feststoff
Bezeichnung:	AL474, ST-1498
R _f -Wert:	0.28 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.07 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.82 (s, 1H, -CH-), 7.53 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 2H,6H-PhNH ₂), 7.47 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 6.72 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 3H,5H-PhNH ₂), 6.38 (br s, 2H, -NH ₂), 2.44 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 183.7, 182.4, 153.0, 145.7, 139.2, 133.6, 130.1, 129.0, 128.1, 120.3, 117.9, 114.0, 21.3.
Schmelzpunkt:	260 °C
ESI-MS:	m/z = 295.1 [M+H] ⁺ , 317.0 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 69.36, H 4.79, N 9.52, S 10.89 Gef.: C 69.00, H 4.85, N 9.49, S 10.63

(Z)-5-(4-Morpholinobenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1633 (366))



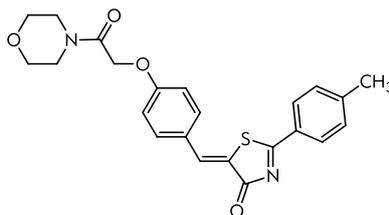
Eine Suspension aus 163 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.85 mmol, 1.0 eq), 186 mg 4-Morpholinbenzaldehyd (**365**) (0.7843 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 3 mL abs. MeOH wird für 15 min in der Mikrowelle auf 90 °C erhitzt.

Der rote Feststoff wird in MeOH suspendiert und abgesaugt.

Ausbeute:	236 mg (76%)
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₂ S
Molmasse:	364.46 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL555, ST-1633
R _f -Wert:	0.34 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.08 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.91 (s, 1H, -CH-), 7.68 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-Ph-N), 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.10 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-Ph-N), 3.75 (t, 4H, ³ J = 4.7 Hz, 3,5-CH ₂ -Morpholin), 3.35 (t, 4H, 2,6-CH ₂ -Morpholin), 2.45 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 184.5, 182.3, 152.7, 146.1, 138.2, 132.8, 130.2, 128.9, 128.3, 122.7, 120.6, 114.1, 65.8, 46.7, 21.
Schmelzpunkt:	208 °C
ESI-MS:	m/z = 365.4 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 69.20, H 5.53, N 7.69, S 8.80 Gef.: C 69.21, H 5.51, N 7.56, S 8.77

8.2.3 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Kondensation mit Thiazol-4(5H)-onen

(Z)-5-(4-(2-Morpholin-2-oxoethoxy)benzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1639 (370))

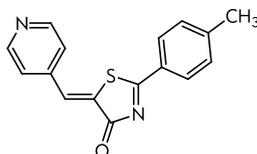


Eine Suspension aus 175 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.92 mmol, 1.0 eq), 240 mg 4-(2-Morpholin-2-oxoethoxy)benzaldehyd (**369**) (0.92 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 3 mL abs. MeOH wird für 15 min in der Mikrowelle auf 90 °C erhitzt.

Das Lösungsmittel der rötlichen Mischung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute:	98 mg (25%)
Summenformel:	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ S*0.75 H ₂ O
Molmasse:	422.50 g/mol
Aussehen:	ockerfarbener Feststoff
Bezeichnung:	AL565, ST-1639
R _f -Wert:	0.06 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.11 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.99 (s, 1H, -CH-), 7.77 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H- Toly), 7.49 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 3H,5H-Toly), 7.13 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-Ph-O-), 5.00 (s, 2H, -CH ₂ -O), 3.63-3.57 (m, 4H, 3,5-CH ₂ -Morpholin), 3.46 (m, 4H, 2,6-CH ₂ -Morpholin), 2.45 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 185.6, 182.2, 165.5, 160.6, 146.5, 137.5, 132.6, 130.2, 128.7, 128.5, 126.2, 123.4, 115.7, 66.0, 65.7, 40.6, 21.4.
Schmelzpunkt:	167 °C
ESI-MS:	m/z = 423.66 [M+H] ⁺ , 445.67 [M+Na] ⁺ , 869.25 [M+Na] ²⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 423.13730 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 423.13732 [M+H] ⁺ (Δ: 0.05 ppm)
CHN:	Ber.: C 63.36, H 5.43, N 6.42, S 7.35 Gef.: C 63.25, H 5.42, N 6.40, S 7.83

(Z)-5-(pyridin-4-ylmethyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1632 (380))



Eine Suspension aus 150 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.78 mmol, 1.0 eq), 74 µL frisch destilliertes 4-Pyridincarbaldehyd (0.78 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2.5 mL abs. MeOH wird für 20 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

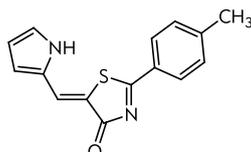
Die schwärzlich, grüne Suspension wird mit etwas MeOH verdünnt und abgesaugt. Das Rohprodukt wird in Toluol gelöst und filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	24 mg (11%)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ OS
Molmasse:	280.34 g/mol
Aussehen:	ockerfarbener Feststoff
Bezeichnung:	AL525, AL527, ST-1632
R _f -Wert:	0.27 (Hex/EE 1:1)

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 8.67$ (d, 2H, $^3J = 5.5$ Hz, 2H,6H-Py), 8.02 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.81 (s, 1H, -CH-), 7.42 (d, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, 3H,5H-Py), 7.31 (d, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, 3H,5H-Tolyl), 2.40 (s, 3H, - CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 177.8, 177.6, 150.5, 150.1, 147.3, 133.8, 131.2, 129.9, 129.0, 128.8, 123.3, 21.8$.
Schmelzpunkt:	223.8 °C
ESI-MS:	$m/z = 281.0$ [M+H] ⁺ , 303.0 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 68.55, H 4.31, N 9.99, S 11.44 Gef.: C 68.61, H 4.28, N 9.62, S 11.07

(Z)-5-((1H-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1630 (381))

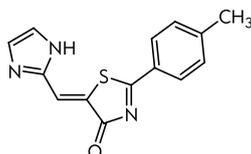


Eine Suspension aus 109 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.57 mmol, 1.0 eq), 54 mg 1H-Pyrrol-2-carbaldehyd (0.57 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 20 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Die rötliche Suspension wird mit etwas MeOH verdünnt und abgesaugt.

Ausbeute:	119 mg (78%)
Summenformel:	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$
Molmasse:	268.33 g/mol
Aussehen:	dunkelroter, feinpulvriger Feststoff
Bezeichnung:	AL529, ST-1630
R_f -Wert:	0.40 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):	$\delta = 11.92$ (br s, 1H, NH), 8.06 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.86 (s, 1H, -CH-), 7.47 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.34 (t, 1H, 5H-Pyrrol), 6.85-6.83 (m, 1H, 4H-Pyrrol), 6.45-6.44 (m, 1H, 3H-Pyrrol), 2.44 (s, 3H, - CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 183.3, 182.0, 145.7, 130.0, 128.8, 128.1, 128.0, 127.1, 126.3, 118.3, 115.3, 112.6, 21.3$.
Schmelzpunkt:	237.8 °C
ESI-MS:	$m/z = 269.44$ [M+H] ⁺ , 291.46 [M+Na] ⁺ , 559.82 [M+Na] ²⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: $m/z = 269.07431$ [M+H] ⁺ Gef.: $m/z = 269.07489$ [M+H] ⁺ (Δ : 2.1 ppm)

(Z)-5-((1H-Imidazol-2-yl)methylen)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1637 (382))



Eine Suspension aus 121 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.63 mmol, 1.0 eq), 63 mg 1H-Imidazole-2-carbaldehyd (0.63 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 10 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

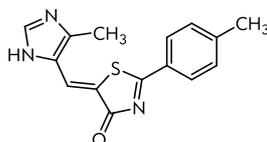
Die grünlich, schwarze Suspension wird mit etwas MeOH verdünnt und abgesaugt.

Ausbeute:	135 mg (80%)
Summenformel:	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$
Molmasse:	268.33 g/mol

8.2.3 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch Kondensation mit Thiazol-4(5H)-onen

Aussehen:	ockerfarbener Feststoff
Bezeichnung:	AL574, ST-1637
R _F -Wert:	0.18 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 12.95 (br s, 1H, NH), 8.11 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.71 (s, 1H, -CH-), 7.55 (s, 1H, 4H/5H-Imidazol), 7.47 (d, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.38 (s, 1H, 4H/5H-Imidazol), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 188.7, 181.8, 146.2, 142.1, 130.0, 128.9, 128.3, 128.3, 125.9, 122.4, 21.3.
Schmelzpunkt:	267 °C
ESI-MS:	m/z = 270.2 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 62.43, H 4.12, N 15.60, S 11.91 Gef.: C 62.16, H 4.10, N 15.22, S 12.05

(Z)-5-((4-Methyl-1H-imidazol-5-yl)methylen)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1686 (383))

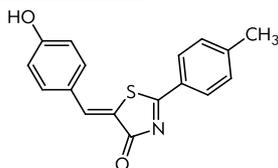


Eine Suspension aus 150 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.78 mmol, 1.0 eq), 89 mg 4-Methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyd (0.78 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 5 min in der Mikrowelle auf 90 °C erhitzt.

Die orangene Suspension wird mit etwas MeOH verdünnt und abgesaugt.

Ausbeute:	194 mg (87%)
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ OS*0.25 H ₂ O
Molmasse:	288.35 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL606, ST-1686
R _F -Wert:	0.38 (DCM/MeOH 9:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 12.68 (br s, 1H, NH), 8.05 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.86-7.84 (m, 2H, -CH- + 2H-Imidazol), 7.44 (d, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 2.44 (s, 6H, -CH ₃ + Imidazol-CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 187.7, 182.3, 145.4, 137.1, 135.8, 132.6, 130.0, 129.5, 128.5, 127.9, 120.9, 21.4, 9.3.
Schmelzpunkt:	258.1 °C
ESI-MS:	m/z = 284.3 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 62.59, H 4.73, N 14.60, S 11.14 Gef.: C 62.98, H 4.70, N 14.42, S 11.27
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 284.08521 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 284.08534 [M+H] ⁺ (Δ: 0.5 ppm)

8.2.4 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch andere Reaktionen

(Z)-5-(4-Hydroxybenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1683 (343))*Methode 1:* nach[272]

Zu einer gelben Lösung aus 200 mg **C06 (182)** (0.66 mmol, 1.00 eq) in 15 mL abs. Dichlormethan werden bei -30 °C (im Kältebad Aceton und flüssiger Stickstoff) 0.32 mL Bortribromid (3.28 mmol, 5.0 eq) zugegeben. Die violette Mischung wird eine Stunde bei -20 °C und dann 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Der Reaktionsmischung wird tropfenweise Wasser zugesetzt, wobei es zur lebhaften Gasentwicklung kommt. Dann werden ca. 50 mL Wasser zugegeben, wobei ein Feststoff entsteht. Die wässrige Phase wird dreimal mit je ca. 250 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten klaren organischen Phasen werden je zweimal mit ca. 500 mL ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Methode 2:

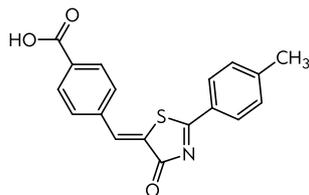
Eine Mischung aus 1.01 g *p*-Tolunitril (**337**) (8.62 mmol, 1.0 eq), 1.05 g 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) (8.62 mmol, 1.0 eq), 0.6 mL Thioglykolsäure (**335**) (8.62 mmol, 1.0 eq) und 1 mL Triethylamin (7.2 mmol, 0.84 eq) wird für 30 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Die feste Mischung wird in wenig MeOH suspendiert und der orangene Feststoff wird abgesaugt.

<i>Ausbeute:</i>	<i>Methode 1:</i> 194 mg (quant.) <i>Methode 2:</i> 832 mg (33%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₇ H ₁₃ NO ₂ *1.0 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	295.36 g/mol
<i>Aussehen:</i>	orangener Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL455, ST-1683
<i>R_f-Wert:</i>	0.29 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 10.50 (s, 1H, -OH), 8.10 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.94 (s, 1H, -CH-), 7.68 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOH), 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 6.96 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 3H,5H-PhOH), 2.45 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 182.3, 160.9, 146.4, 138.1, 133.2, 130.2, 128.7, 128.4, 124.4, 122.0, 116.5, 104.5, 21.4.
<i>Schmelzpunkt:</i>	280.2 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 294.1 [M-H] ⁻
<i>CHN:</i>	Ber.: C 65.16, H 4.82, N 4.47, S 10.23 Gef.: C 65.18, H 4.67, N 4.10, S 10.07
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: m/z = 296.07398 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 296.07417 [M+H] ⁺ (Δ: 0.6 ppm)

8.2.4 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch andere Reaktionen

(Z)-4-((4-Oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)benzoesäure (ST-1684 (350)) nach^[318]

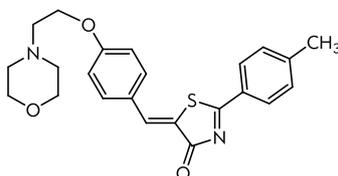


Eine Suspension aus 50 mg (Z)-4-((4-Oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)benzoesäuremethylester, **ST-1685 (345)**, (0.15 mmol, 1.0 eq) in 1.1 mL Essigsäure und 0.15 mL konz. HCl wird im verschlossenen Vial für zwei Stunden auf 90 °C erhitzt.

Das Lösemittel der gelben Suspension wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Aceton suspendiert und abgesaugt. Das Rohprodukt wird in Wasser suspendieren und lyophilisiert.

Ausbeute:	36 mg (75%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₃ NO ₂ S
Molmasse:	323.37 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL603, ST-1684
R _F -Wert:	0.01 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.12-8.06 (m, 4H, 3H,5H-Tolyl + 2H,6H-PhCOOH), 8.01 (s, 1H, -CH-), 7.88 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-PhCOOH), 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 2.43 (s, 3H, -CH ₃).
Schmelzpunkt:	327.8 °C (Sublimation)
ESI-MS:	m/z = 321.8 [M-H] ⁻
CHN:	Ber.: C 66.86, H 4.05, N 4.33, S 9.92 Gef.: C 66.50, H 4.12, N 4.24, S 9.89

(Z)-5-(4-(2-Morpholinoethoxy)benzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1499 (361))



Zu einer siedenden Lösung aus 250 mg (Z)-5-(4-Hydroxybenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on, **ST-1683 (343)**, (0.85 mmol, 1.00 eq), 585 mg Kaliumcarbonat (4.23 mmol, 5.0 eq) und 155 mg Kaliumiodid (0.93 mmol, 1.1 eq) in 25 mL abs. MeCN wird eine Suspension aus 173 mg Ethylchloromorpholin Hydrochlorid (**360**) (0.93 mmol, 1.10 eq) in ca. 5 mL MeCN zugegeben und die Mischung für 20 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösungsmittel der dunklen, grünlichen Reaktionssuspension wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 50 mL Wasser aufgenommen und siebenmal mit je ca. 75 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

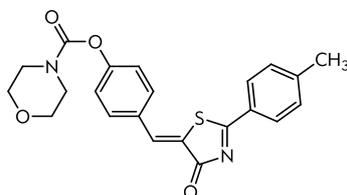
Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und mit Ammoniak gesättigtem MeOH (100 → 95:5) aufgereinigt und anschließend aus MeOH umkristallisiert.

Ausbeute:	91 mg (26%)
Summenformel:	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₃ S
Molmasse:	408.51 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL464/AL467, ST-1499
R _F -Wert:	0.41 (DCM/MeOH ges. NH ₃ 95:5)

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 8.12$ (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 8.00 (s, 1H, -CH-), 7.64 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, 2H,6H-Ph-O-), 7.36 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.02 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3H,5H-Ph-O-), 4.19 (t, 2H, $^3J = 5.6$ Hz, -N- CH_2 - CH_2 -O-), 3.75 (t, 4H, $^3J = 4.6$ Hz, 2,6- CH_2 -Morpholin), 2.84 (t, 2H, $^3J = 5.6$ Hz, -N- CH_2 - CH_2 -O-), 2.59 (t, 4H, $^3J = 4.6$ Hz, 3,5- CH_2 -Morpholin), 2.48 (s, 3H, - CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 167.9, 161.1, 154.2, 146.3, 138.0, 132.7, 129.9, 129.4, 128.8, 126.8, 124.0, 115.4, 66.9, 66.2, 57.5, 54.1, 21.9$.
Schmelzpunkt:	166.7 °C
ESI-MS:	$m/z = 409.20$ [M+H] ⁺ , 817.35 [M+H] ²⁺
CHN:	Ber.: C 67.62, H 5.92, N 6.86, S 7.85 Gef.: C 67.30, H 5.97, N 6.73, S 8.04

(Z)-4-((4-Oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)phenyl morpholin-4-carboxylat (ST1640 (364)) nach[353]



Zu einer orangenen Lösung aus 150 mg (Z)-5-(4-Hydroxybenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on, **ST-1683 (343)**, (0.51 mmol, 1.00 eq) in 20 mL abs. Pyridin werden 155 mg Morpholin-4-carbonylchlorid (**363**) (1.02 mmol, 2.0 eq) gegeben und die Mischung für 7 Stunden auf 50 °C erwärmt.

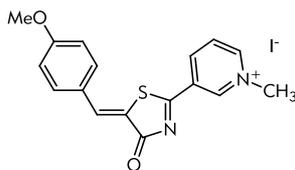
Der gelben Reaktionslösung werden ca. 100 mL 3M HCl zugesetzt und die Suspension wird fünfmal mit je ca. 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten gelblichen organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute:	136 mg (66%)
Summenformel:	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} \cdot 0.75 \text{H}_2\text{O}$
Molmasse:	408.47 g/mol
Aussehen:	gelber, feinpulvriger Feststoff
Bezeichnung:	AL579, ST-1640
R_f -Wert:	0.19 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 8.11$ (d, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 2H,6H-Ph-O-), 8.02 (s, 1H, -CH-), 7.69 (d, 2H, $^3J = 8.6$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.37 (d, 2H, $^3J = 8.6$ Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.28 (d, 2H, 3H,5H-Ph-O-), 3.79-3.60 (m, 8H, Morpholin), 2.48 (s, 3H, - CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 186.1, 182.0, 153.0, 152.3, 146.8, 136.6, 131.8, 130.4, 130.2, 128.6, 128.4, 125.8, 122.7, 65.6, 21.4$.
Schmelzpunkt:	220 °C
ESI-MS:	$m/z = 409.3$ [M+H] ⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: $m/z = 409.12176$ [M+H] ⁺ Gef.: $m/z = 409.12165$ [M+H] ⁺ (Δ : 0.27 ppm)
CHN:	Ber.: C 62.62, H 5.14, N 6.64, S 7.60 Gef.: C 62.75, H 4.84, N 6.63, S 7.77

8.2.4 Synthese von Aryliden-Aryl-Thiazolonen durch andere Reaktionen

(Z)-3-(5-(4-Methoxybenzyliden)-4-oxo-4,5-dihydrothiazol-2-yl)-1-methylpyridiniumiodid (ST-1687 (387))

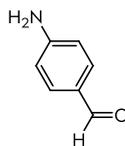


Zu einer gelben Lösung aus 100 mg (Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(pyridin-3-yl)thiazol-4(5H)-on, **ST-1638 (386)**, (0.54 mmol, 1.0 eq) in 25 mL abs. Dichlormethan werden 0.23 mL Methyljodid (3.57 mmol, 10.0 eq) gegeben und die Mischung wird für 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach 6 Stunden werden erneute 0.23 mL Methyljodid (3.57 mmol, 10.0 eq) zugegeben und die Mischung bei 40 °C für 18 Stunden gerührt.

Der entstandene rote Feststoff abgesaugt und mit Dichlormethan gewaschen.

<i>Ausbeute:</i>	68 mg (46%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₇ H ₁₅ IN ₂ O ₂ S
<i>Molmasse:</i>	311.38 g/mol + 126.91 g/mol
<i>Aussehen:</i>	dunkelroter Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL607, ST-1687
<i>R_f-Wert:</i>	0.01 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 9.86 (s, 1H, 2H-Py), 9.25 (pt, 2H, ³ J = 7.7 Hz, 4H,6H-Py), 8.41-8.35 (m, 1H, 5H-Py), 8.19 (s, 1H, -CH-), 7.84 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.20 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 4.49 (s, 3H, N ⁺ -CH ₃), 3.89 (s, 3H, -OCH ₃).
<i>¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 181.0, 180.9, 162.6, 149.5, 145.4, 143.4, 140.9, 133.3, 130.7, 128.3, 125.6, 122.2, 115.3, 55.8, 48.5.
<i>Schmelzpunkt:</i>	231.1 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 311.3 [M+H] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 46.24, H 3.45, N 6.39, S 7.32 Gef.: C 46.24, H 3.41, N 6.18, S 7.27

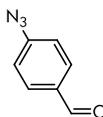
8.2.5 Synthese von Aldehyden und andere Bausteinen

4-Aminobenzaldehyd (352)^[346]

Eine Lösung aus 500 mg 4-Nitrobenzaldehyd (**351**) (3.31 mmol, 1.0 eq) und 3.73 g (16.50 mmol, 5.0 eq) Zinndichlorid Dihydrat in 10 mL abs. EtOH wird für 30 min auf 70 °C erhitzt.

Die Mischung wird auf ca. 50 mL Eis gegeben und mit ges. NaHCO₃-Lösung ein pH 8-9 eingestellt. Dann wird die Mischung fünfmal mit je ca. 200 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigen organischen Phasen werden einmal mit ca. 500 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

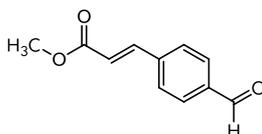
Ausbeute:	382 mg (95%)
Summenformel:	C ₇ H ₇ NO
Molmasse:	121.14 g/mol
Aussehen:	dreieckig-orangener Feststoff
R _F -Wert:	0.32 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.57 (s, 1H, -CHO), 7.55 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 2H,6H-PhCHO), 6.62 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 3H,5H-PhCHO), 6.29 (br s, 2H, -NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 121.8 [M+H] ⁺ , 241.9 [M+H] ²⁺

4-Azidobenzaldehyd (390)^[360,361]

Zu einer 0 °C kalten Suspension aus 168 mg 4-Amidobenzaldehyd (**352**) (1.387 mmol, 1.0 eq) in 15 mL 4M HCl wird eine Lösung aus 191 mg Natriumnitrit (2.77 mmol, 2.0 eq) in 1.5 mL Wasser zugegeben und die Mischung 30 min gerührt. Dann wird eine Lösung aus 180 mg Natriumazid (2.77 mmol, 2.0 eq) in 1.5 mL Wasser zugetropft und die Mischung 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionsmischung wird dreimal mit je ca. 50 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	178 mg (87%)
Summenformel:	C ₇ H ₅ N ₃ O
Molmasse:	147.13 g/mol
Aussehen:	dunkel, orangenes Öl
R _F -Wert:	0.63 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.95 (s, 1H, -CHO-), 7.94 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.33 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-PhCHO).

(E)-3-(4-Formylphenyl)acrylsäuremethylester (354)^[347]

Zu einer Mischung aus 2.00 g 4-Brombenzaldehyd (**353**) (10.8 mmol, 1.0 eq), 975 mg frisch im Vakuum entwässertes Natriumacetat (11.89 mmol, 1.1 eq), 97 mg Palladiumdiacetat (0.43 mmol, 0.04 eq) in 15 mL abs. NMP werden unter Argon 1.4 mL Methylacrylat (15.13 mmol, 1.4 eq) gegeben und die Mischung für 100 min im verschlossenen Vial auf 115 °C erhitzt.

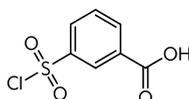
8.2.5 Synthese von Aldehyden und andere Bausteinen

Die schwarze Mischung wird auf 100 mL Wasser gegeben und dreimal mit je ca. 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten orangenen, organischen Phasen werden zweimal mit je ca. 100 mL Wasser und einmal mit ca. 100 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das resultierende dunkle, orangene Öl wird mit EtOH versetzt und im Ultraschallbad bildet sich eine gelblicher Feststoff der abgesaugt und mit etwas EtOH gewaschen wird. Das Filtrat wird aufkonzentriert und weiteres Produkt abgesaugt.

Ausbeute:	1.30 g (63%)
Summenformel:	C ₁₁ H ₁₀ O ₃
Molmasse:	190.20 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.59 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.03 (s, 1H, -CHO), 7.94 (br s, 4H, 3H,5H-Ph + 2H,6H-Ph), 7.74 (d, 1H, ³ J = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-), 6.82 (d, 1H, ³ J = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-), 3.75 (s, 3H, -COOCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 189.6 [M-H] ⁻

3-(Chlorosulfonyl)benzoesäure (356)^[348]



Zu 5.0 g Benzoesäure (**355**) (40.9 mmol 1.0 eq) werden 20 mL Chlorsulfonsäure (300.4 mmol, 7.34 eq) gegeben und die Mischung wird für 2 Stunden auf 120 - 125 °C erhitzt.

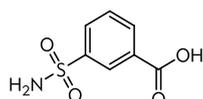
Die leicht gelbliche Mischung wird tropfenweise auf ca. 200 mL Eis gegeben, wobei eine heftige exotherme Reaktion einsetzt und ein weißer Feststoff entsteht.

Der Feststoff wird abgesaugt und in ca. 150 mL Ethylacetat gelöst. Die wässrige Phase wird abgetrennt und die organische Phase wird dreimal mit je ca. 25 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das weiße, feste Rohprodukt wird gemörsert, in Hexan suspendiert und abgesaugt.

Ausbeute:	7.42 g (82%)
Summenformel:	C ₇ H ₅ ClO ₄ S
Molmasse:	220.63 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.65 (DCM/MeOH 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.78 (t, 1H, ⁴ J = 1.6 Hz, 1H-Ph), 8.48 (td, 1H, ³ J = 7.8 Hz, ⁴ J = 1.3 Hz, 6H-Ph), 8.30 (ddd, 1H, ³ J = 8.0 Hz, ⁴ J = 1.2 Hz, 3H-Ph), 7.80 (t, 1H, ³ J = 7.9 Hz, 5H-Ph).
ESI-MS:	m/z = 219.01 [M-H] ⁻

3-Sulfamoylbenzoesäure (357)^[349]



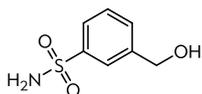
Zu 75 mL 0 °C kalter, 25%iger Ammoniaklösung (1002 mmol 30.0 eq) werden portionsweise 7.4 g 3-(Chlorosulfonyl)benzoesäure (**356**) (33.54 mmol, 1.0 eq) gegeben und die Mischung wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in ca. 25 mL Wasser suspendiert und mit ca. 40 mL konz. HCl versetzt. Die homogenisierte weiße Suspension wird abgesaugt und mit ca. 100 mL Wasser nachgewaschen. Das Rohprodukt wird in ca. 10 mL Wasser suspendiert und lyophilisiert.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Ausbeute:	6.42 g (95%)
Summenformel:	C ₇ H ₇ NO ₄ S
Molmasse:	201.20 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.11 (DCM/EtOH 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 13.44 (br s, 1H, -COOH), 8.39 (t, 1H, ⁴ J = 1.6 Hz, 1H-Ph), 8.13 (td, 1H, ³ J = 7.8 Hz, ⁴ J = 1.3 Hz, 6H-Ph), 8.04 (td, 1H, ³ J = 7.9 Hz, ⁴ J = 1.2 Hz, 3H-Ph), 7.71 (t, 1H, ³ J = 7.9 Hz, 5H-Ph), 7.49 (br s, 2H, -NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 200.07 [M-H] ⁻

3-(Hydroxymethyl)benzolsulfonamid (358 D15)^[350]



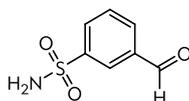
Zu einer 0 °C kalten Suspension aus 2.50 g 3-Sulfamoylbenzoesäure (**357**) (12.4 mmol 1.0 eq) in 20 mL abs. THF werden, unter Argon 37 mL 1M Boran*THF Lösung (37.3 mmol, 3.0 eq) tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann werden weitere 15 mL Boran*THF zugegeben und wiederum für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die trübe Suspension wird auf 0 °C gekühlt und mit ca. 45 mL MeOH gequenchet.

Nach 15 min rühren werden ca. 100 mL 2M HCl zugegeben. Das MeOH wird im Vakuum entfernt. Der wässrige Rückstand wird dreimal mit je ca. 150 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je ca. 100 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	2.10 g (90%)
Summenformel:	C ₇ H ₉ NO ₃ S
Molmasse:	187.22 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _f -Wert:	0.49 (DCM/MeOH 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 7.82 (s, 1H, 1H-Ph), 7.69 (td, 1H, ³ J = 4.5 Hz, ⁴ J = 1.4 Hz, 4H-Ph), 7.52-7.50 (d, 2H, 3H,5H-Ph), 7.32 (br s, 2H, -NH ₂), 5.41 (t, 1H, ³ J = 5.7 Hz, -OH), 4.57 (d, 2H, ³ J = 5.5 Hz, -CH ₂ -).
ESI-MS:	m/z = 186.08 [M-H] ⁻ , 222.07 + 224.07 [M+Cl] ⁻

3-Formylbenzolsulfonamid (359)^[351]



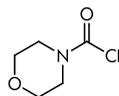
Eine Mischung aus 1.0 g 3-(Hydroxymethyl)benzolsulfonamid (**358**) (5.34 mmol 1.0 eq) in 50 mL abs. Aceton und 4.64 g Mangandioxid (53.4 mmol, 10.0 eq) wird für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt.

Die Mischung wird mehrmals über Celite, einmal über Kieselgel und durch einen Faltenfilter filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	0.75 g (75%)
Summenformel:	C ₇ H ₇ NO ₃ S
Molmasse:	185.20 g/mol
Aussehen:	grauer Feststoff
R _f -Wert:	0.21 (DCM/MeOH 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.10 (s, 1H, -CHO), 8.32 (t, 1H, ⁴ J = 1.5 Hz, 1H-Ph), 8.16-8.10 (m, 2H,4H,6H-Ph), 7.83 (t, 1H, ³ J = 7.7 Hz, 5H-Ph), 7.55 (br s, 2H, -NH ₂).
ESI-MS:	m/z = 184.06 [M-H] ⁻

8.2.5 Synthese von Aldehyden und andere Bausteinen

Morpholin-4-carbonylchlorid (363)^[352]

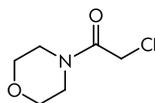


Zu einer -10 °C kalten Mischung aus 1.72 g Triphosgen (5.78 mmol, 0.5 eq) in 150 mL abs. Dichlormethan wird tropfenweisen eine Lösung aus 1 mL Morpholin (**362**) (11.56 mmol, 1.0 eq) und 2.4 mL Triethylamin (17.34 mmol, 1.5 eq) in 30 mL abs. Dichlormethan über 45 min zugegeben. Die Reaktionslösung wird 75 min gerührt, ohne die Kühlung zu erneuern.

Die klare Reaktionslösung wird im Vakuum aufkonzentriert und das ausfallende Triethylamin Hydrochlorid wird mehrfach abgesaugt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute:	1.88 g (quant. angenommen)
Summenformel:	C ₅ H ₈ ClNO ₂
Molmasse:	149.58 g/mol
Aussehen:	braunes Öl

2-Chlor-1-morpholinethanon (368)^[354]

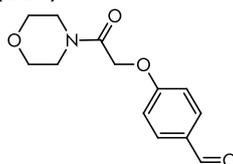


Zu einer Suspension aus 0.5 mL Morpholin (**362**) (5.78 mmol, 1.0 eq), 1.60 g Kaliumcarbonat (11.57 mmol, 2.0 eq) in 15 mL abs Toluol werden 0.45 mL Chloracetylchlorid, **355**, (5.78 mmol, 1.0 eq) gegeben und die Mischung wird für 2.5 Stunden auf 60 °C erhitzt.

Die Suspension wird filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	0.78 g (64%)
Summenformel:	C ₆ H ₁₀ ClNO ₂
Molmasse:	163.60 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _f -Wert:	0.43 (DCM/MeOH 9:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 4.06 (s, 2H, -CH ₂ -Cl), 3.80-3.51 (m, 8H, 4xCH ₂ -Morpholin).

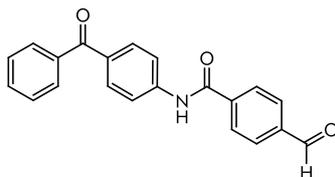
4-(2-Morpholin-2-oxoethoxy)benzaldehyd (369)^[354]



Zu einer siedenden Suspension aus 376 mg 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) (3.08 mmol, 1.0 eq), 1.28 g Kaliumcarbonat (9.23 mmol, 3.0 eq) in 5 mL abs. THF wird eine Lösung aus 755 mg 2-Chlor-1-morpholinethanon (**368**) (4.62 mmol, 1.5 eq) in 10 mL abs. THF gegeben und die Mischung wird für 24 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der gelbe Rückstand in ca. 20 mL ges. NaCl-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

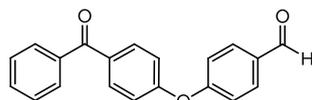
Ausbeute:	780 g (quant.)
Summenformel:	C ₁₃ H ₁₅ NO ₄
Molmasse:	163.60 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl mit Feststoff
R _f -Wert:	0.07 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.90 (s, 1H, -CHO), 7.86 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.07 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhCHO), 4.80 (s, 2H, -CH ₂ -O-PhCHO), 3.73-3.55 (m, 8H, 4xCH ₂ -Morpholin).

N-(4-benzoylphenyl)-4-formylbenzamid (393) ^[362]

Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 175 mg 4-Formylbenzoesäure (**320**) (1.17 mmol, 1.0 eq) in 6 mL abs. THF und 5 Tropfen DMF werden 0.1 mL Oxalylchlorid (1.52 mmol, 1.3 eq) langsam zugetropft. Die trübe Lösung wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann 20 min bei 40 °C. Das Lösemittel der Suspension wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 3 mL abs. THF aufgenommen und tropfenweise zu einer 0 °C kalten Lösung aus 264 mg 4-Aminobenzophenon (**392**) (1.34 mmol, 1.15 eq) und 0.4 mL DIPEA (2.33 mmol, 2.0 eq) in 5 mL abs. THF zugegeben. Die Reaktionssuspension wird für 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösemittel der wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 35 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je 40 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute:	380 mg (99%)
Summenformel:	C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O
Molmasse:	329.35 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
R _f -Wert:	0.42 (Hex/EE 3:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.82 (s, 1H, -NH-), 10.13 (s, 1H, -CHO), 8.17 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-PhCHO), 8.08 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-PhCHO), 8.00 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph), 7.83-7.66 (m, 5H, 2H,3H,5H,6H-Ph-NH- + 4H-Ph), 7.59 (d, 2H, ³ J = 7.5 Hz, 3H,5H-Ph).
ESI-MS:	m/z = 253.7 [M-Ph] ⁺ , 330.3 [M+H] ⁺

4-(4-Benzoylphenoxy)benzaldehyd (397) nach ^[363,364]

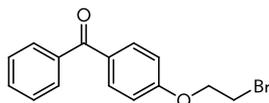
Eine Mischung aus 282 mg 4-Hydroxybenzophenon (**395**) (1.42 mmol, 1.0 eq), 159 mg Kalium tert.-Butylat (1.42 mmol 1.0 eq), 0.15 mL 4-Fluorbenzaldehyd (**396**) (1.42 mmol, 1 eq) in 2.5 mL abs. DMF wird für 30 min bei 160 °C und für 30 min. bei 180 °C in der Mikrowelle erhitzt.

Die Mischung wird auf ca. 15 mL Eiswasser gegeben wobei ein beiger Feststoff entsteht. Die Mischung wird für 10 min gerührt, abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Ausbeute:	396 mg (92%)
Summenformel:	C ₂₀ H ₁₄ O ₃
Molmasse:	302.32 g/mol
Aussehen:	beiger Feststoff
R _f -Wert:	0.42 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.80 (s, 1H, -CHO), 8.17 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.85 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph), 7.77-7.55 (m, 5H, 3H,5H-Ph-O- + 3H,5H,4H-Ph), 7.32-7.25 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 3H,5H-Ph).
ESI-MS:	m/z = 303.21 [M+H] ⁺

8.2.5 Synthese von Aldehyden und andere Bausteinen

(4-(2-Bromethoxy)phenyl)(phenyl)methanon (399) ^{nach[365]}



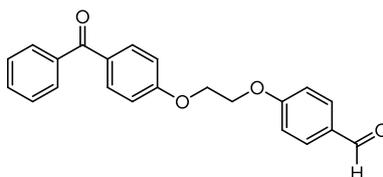
Einer Mischung aus 1 g 4-Hydroxybenzophenon (**395**) (5.04 mmol, 1.0 eq), 17 mg Tetrabutylammoniumbromid (0.05 mmol, 0.1 eq), 400 mg NaOH (10.1 mmol, 2.0 eq) und 4 mL Dibromethan (46 mmol, 9 eq) in 4 mL Wasser wird für 21 Stunden zum Sieden erhitzt.

Die wässrige Phase wird abgetrennt und einmal mit ca. 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Der ölige Rückstand aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute:	965 mg (63%)
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₃ BrO ₂
Molmasse:	305.17 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.63 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 7.77-7.52 (m, 7H, 3H,5H-Ph-O- + 2H,3H,4H,5H, 6H-Ph), 7.12 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-Ph-O-), 4.44 (t, 2H, ³ J = 5.4 Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Br), 3.85 (t, 2H, ³ J = 5.3 Hz, O-CH ₂ -CH ₂ -Br).
ESI-MS:	m/z = 329.1 [M+Na] ⁺

4-(2-(4-Benzoylphenoxy)ethoxy)benzaldehyd (400) ^{nach[291]}

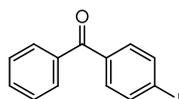


Eine Suspension aus 290 mg (4-(2-Bromethoxy)phenyl)(phenyl)methanon (**399**) (0.95 mmol, 1.00 eq), 116 mg 4-Hydroxybenzaldehyd (**323**) (0.95 mmol, 1.00 eq) und 1.55 g Caesiumcarbonat (4.75 mmol, 1.7 eq) in 10 mL abs DMF wird bei 80 °C für 21 Stunden gerührt.

Die weißliche Suspension wird auf ca. 25 mL Eiswasser gegeben und für 10 min gerührt. Der entstandene weiße Feststoff wird abgenutscht und mit Wasser nachgewaschen.

Ausbeute:	328 mg (quant.)
Summenformel:	C ₂₀ H ₁₄ O ₃
Molmasse:	346.38 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.45 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 9.89 (s, 1H, -CHO), 7.89 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.76 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Ph), 7.68-7.55 (m, 5H, 3H,5H-Ph-O- + 3H,5H,4H-Ph), 7.22-7.14 (m, 4H, 2H,6H-Ph-O- + 3H,5H-Ph), 4.49 (s, 4H, O-(CH ₂) ₂ -O).

4-Iodbenzophenon (402) ^[366]



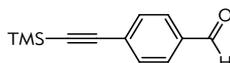
6.75 g Silicaschwefelsäure (Hergestellt durch Zutropfen von 9 mL Chlorsulfonsäure zu 20 g Silicagel und 30 min heftiges Rühren bei Raumtemperatur)^[455], 2.0 g 4-Aminobenzophenon (**392**) (10.1 mmol, 1.0 eq) und 1.4 g Natriumnitrit (20.2 mmol, 2.0 eq) werden im Mörser homogenisiert. Dann werden 5 Tropfen Wasser hinzugegeben, wobei nitrose Gase entstehen und die Mischung ca. 20 Minuten gemörsert. Zu der gelb gewordenen Mischung werden dann 4.21 g Kaliumiodid (25.4 mmol, 2.5 eq) gegeben und es wird weitere 10 Minuten gemörsert, wobei die Mischung schwarz wird.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Die Mischung wird in ca. 35 mL Ethylacetat ausgeschlammmt, filtriert und mit 150 mL Ethylacetat nachgewaschen. Die organische Phase wird dreimal mit je ca. 100 mL 10% Na₂SO₃-Lösung und dreimal mit je 100 mL 2M HCl gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute:	1.25 g (40%)
Summenformel:	C ₂₂ H ₁₄ O ₂
Molmasse:	308.11 g/mol
Aussehen:	beiger Feststoff
R _F -Wert:	0.7 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 7.96 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-Phl), 7.75-7.66 (m, 3H, 2H,4H,6H-Ph), 7.59-7.49 (m, 4H, 3H,5H-Ph + 3H,5H-Phl).

4-((Trimethylsilyl)ethynyl)benzaldehyd (403) ^{nach[367]}

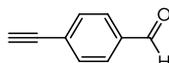


Eine Mischung aus 2.5 g 4-Brombenzaldehyd (**353**) (13.5 mmol, 1.0 eq), 124 mg Triphenylphosphin (0.47 mmol, 0.035 eq) in 15 mL abs. Triethylamin wird für 10 min mit Argon entgast. Dann werden 25 mg Palladiumdiacetat (0.11 mmol, 0.008 eq) und 2.12 mL Ethintrimethylsilan (15.27 mmol, 1.13 eq) zu gegeben und die Mischung für 4 Stunden im verschlossenen Vial zum Sieden erhitzt.

Die feststoffhaltige Lösung wird abgesaugt, mit Hexan nachgewaschen und das Filtrat über Kieselgel filtriert. Das Lösemittel des Filtrats wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und Petrolether (4:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	2.54 g (93%)
Summenformel:	C ₁₂ H ₁₄ OSi
Molmasse:	202.32 g/mol
Aussehen:	gelblicher Feststoff
R _F -Wert:	0.51 (Hex/EE 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 10.00 (s, 1H, -CHO), 7.24 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.60 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-PhCHO), 0.27 (s, 9H, -Si(CH ₃) ₃).
ESI-MS:	m/z = 203.7 [M+H] ⁺

4-Ethynylbenzaldehyd (404) ^[367,368]



Eine Mischung aus 2.5 g 4-((Trimethylsilyl)ethynyl)benzaldehyd (**403**) (12.5 mmol, 1.0 eq), 250 mg K₂CO₃ (1.8 mmol, 0.14 eq) in 50 mL abs. Methanol wird für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 100 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 75 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je ca. 100 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das schwarze Rohprodukt kann säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (4:1) aufgereinigt (17%).

Besser ist eine Aufreinigung durch Sublimation im Vakuum (4*10⁻² mbar, 80 °C)^[369]. Dabei können mit einer Sublimationsapparatur Ausbeuten größer 30% erzielt werden.

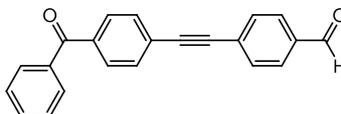
Ausbeute:	471 mg (29%)
Summenformel:	C ₉ H ₆ O
Molmasse:	130.14 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.42 (Hex/EE 4:1)

8.2.5 Synthese von Aldehyden und andere Bausteinen

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.02$ (s, 1H, -CHO), 7.84 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.64 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 3H,5H-PhCHO), 3.29 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$).

ESI-MS: $m/z = 131.11$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-((4-Benzoylphenyl)ethynyl)benzaldehyd (**405**) ^{nach^[370]}



Eine Mischung aus 538 mg 4-Iodobenzophenon (**402**) (1.74 mmol, 1.0 eq), 114 mg Triphenylphosphin (0.44 mmol, 0.25 eq) in 15 mL abs. Triethylamin wird für 15 min mit Argon entgast. Dann werden 78 mg Palladiumdiacetat (0.35 mmol, 0.2 eq) und 227 mg 4-Ethynylbenzaldehyd (**404**) (1.74 mmol, 1.0 eq) zu gegeben und die Mischung für 4 Stunden im verschlossenen Vial zum Sieden erhitzt.

Die Lösung wird filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 188 mg (35%)

Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{O}_2$

Molmasse: 310.35 g/mol

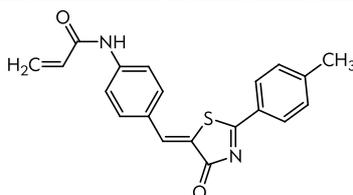
Aussehen: hell beiger Feststoff

R_f -Wert: 0.49 (Hex/EE 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.06$ (s, 1H, -CHO), 7.98 (d, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 2H,6H-PhCHO), 7.85-7.56 (m, 11H, 2H,3H,4H,5H,6H-Ph + 3H,5H-Ph-O- + 2H,3H,5H,6H-(CO)Ph-).

ESI-MS: $m/z = 311.19$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

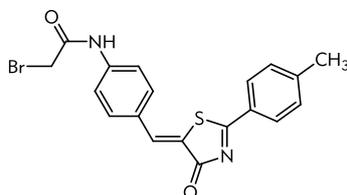
8.2.6 Synthese der zum kovalent Labeling fähigen Aryl-Aryl-Thiazolone

(Z)-N-(4-((4-Oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)phenyl)acrylamid (ST-1500 (388)) ^{nach[313]}

Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 87 mg (Z)-5-(4-Aminobenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on, **ST-1498 (349)**, (0.30 mmol, 1.0 eq) und 40 µL Triethylamin (0.30 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. Acetonitril wird eine Lösung aus 25 µL Acrylsäurechlorid (0.30 mmol, 1.0 eq) in 4 mL abs. Acetonitril zugetropft und die Reaktionsmischung wird 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionssuspension wird abgesaugt und der Feststoff wird mit etwas Acetonitril nachgewaschen. Das Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute:	75 mg (73%)
Summenformel:	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ S*0.5 H ₂ O
Molmasse:	348.42 g/mol
Aussehen:	dunkelroter Feststoff
Bezeichnung:	AL476, ST-1500
R _f -Wert:	0.28 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.54 (s, 1H, -NH-), 8.12 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 3H,5H-Ph-NH-), 7.96 (s, 1H, -CH _{yliden} -), 7.89 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.80 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.50 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Ph-NH-), 6.48 (dd, 1H, ³ J _{cis} = 9.8 Hz, ³ J _{trans} = 16.9 Hz, H ₂ C=CH-), 6.31 (dd, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, ³ J _{trans} = 14.9 Hz, HH _{trans} C=CH-), 5.83 (dd, 1H, ⁴ J = 2.0 Hz, ³ J _{cis} = 9.8 Hz, HH _{cis} C=CH-), 2.46 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 164.3, 163.6, 163.2, 159.8, 146.6, 141.8, 137.2, 133.3, 131.9, 131.5, 130.2, 128.6, 124.3, 119.6, 118.6, 21.5.
Schmelzpunkt:	242 °C (Sublimation)
ESI-MS:	m/z = 349.24 [M+H] ⁺ , 371.22 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 67.21, H 4.79, N 7.84, S 8.97 Gef.: C 67.21, H 4.80, N 8.04, S 8.88

(Z)-2-Brom-N-(4-((4-oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)phenyl)acetamid (ST-1631 (389)) ^{nach [358,359]}

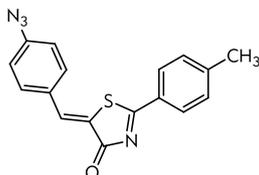
Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 50 µL Bromoacetyl bromid (**341**) (0.56 mmol, 1.1 eq), 85 µL Triethylamin (0.61 mmol, 1.2 eq) in 3 mL abs. Dichlormethan wird eine Lösung aus 150 mg (Z)-5-(4-Aminobenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on, **ST-1498 (349)**, (0.51 mmol, 1.0 eq) in 2 mL abs. Dichlormethan zugetropft und die Reaktionsmischung wird 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden werden weiter 1.1 eq Bromoacetyl bromide zugegeben.

Der entstanden Feststoff wird abgesaugt und aus Methanol umkristallisiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (98:2) aufgereinigt.

8.2.6 Synthese der zum kovalent Labeling fähigen Aryl-Aryl-Thiazolone

Ausbeute:	62 mg (29%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₅ BrN ₂ O ₂ S
Molmasse:	415.30 g/mol
Aussehen:	brauner Feststoff
Bezeichnung:	AL514, ST-1631
R _F -Wert:	0.14 (DCM/MeOH 98:2)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.78 (s, 1H, -NH-), 8.11 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 3H,5H-Ph-NH-), 7.97 (s, 1H, -CH-), 7.81 (s, 4H, 2H,6H-Toyl + 3H,5H-Toyl), 7.50 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Ph-NH-), 4.09 (s, 2H, -CH ₂ Br), 2.46 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 185.8, 182.1, 165.2, 146.6, 141.2, 136.9, 131.8, 131.6, 130.1, 128.5, 128.4, 124.4, 119.4, 30.2, 21.4.
Schmelzpunkt:	235-240 °C
ESI-MS:	m/z = 413.3, 415.3 [M-H] ⁻ , 493.3, 495.2, 497.2 [M+Br] ⁻
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 415.01104, 417.00899 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 415.01116, 417.00899 [M+H] ⁺ (Δ: 0.2 ppm)

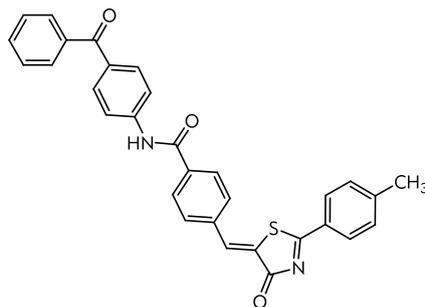
(Z)-5-(4-Azidobenzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1692 (391))



Zu einer Suspension aus 50 g 4-Azidobenzaldehyd (**390**) (0.34 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. EtOH werden 65 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.34 mmol, 1.0 eq) und zwei Tropfen Triethylamin gegeben und die Mischung wird für 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Der ockerfarbende Feststoff wird abgesaugt und mit etwas EtOH nachgewaschen.

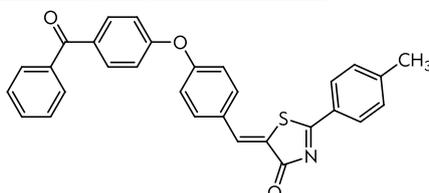
Ausbeute:	78 mg (72%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₂ N ₄ OS
Molmasse:	320.37 g/mol
Aussehen:	dunkel, ockerfarbender Feststoff
Bezeichnung:	AL646, ST-1692
R _F -Wert:	0.62 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.11 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Toyl), 8.02 (s, 1H, -CH-), 7.86 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,6H-PhN ₃), 7.50 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 3H,5H-Toyl), 7.33 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-PhN ₃), 2.46 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 183.4, 171.5, 150.8, 143.5, 136.5, 132.5, 132.4, 130.3, 130.3, 128.6, 120.2, 104.5, 21.3.
Schmelzpunkt:	174 °C
ESI-MS:	m/z = 293.1 [M-N ₂] ⁺ , 321.3 [M+H] ⁺ , 343.5 [M+Na] ⁺ , 663.1 [M+Na] ²⁺
CHN:	Ber.: C 63.73, H 3.78, N 17.49, S 10.01 Gef.: C 63.46, H 3.82, N 16.97, S 9.95

(Z)-N-(4-Benzoylphenyl)-4-((4-oxo-2-p-tolylthiazol-5(4H)-yliden)methyl)benzamid (ST-1496 (394))

Eine Suspension aus 98 mg 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) (0.516 mmol, 1.0 eq), 170 mg *N*-(4-benzoylphenyl)-4-formylbenzamid (**393**) (0.52 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 3.5 mL EtOH wird 15 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Die gelb, grünliche Suspension wird mit EtOH aufgeschlämmt, abgesaugt und mit etwas Ethanol nachgewaschen.

Ausbeute:	176 mg (68%)
Summenformel:	C ₃₁ H ₂₂ N ₂ O ₃ S
Molmasse:	502.58 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL639, ST-1692
R _f -Wert:	0.45 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 10.77 (s, 1H, -NH-), 8.15 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Tolyl + 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Benzamid), 8.11 (s, 1H, -CH-), 8.03-7.96 (m, 4H, 3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Benzamid + 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Ph), 7.83-7.65 (m, 5H, 2 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Ph-NH- + 4 <i>H</i> -Ph), 7.59 (d, 2H, ³ J = 7.5 Hz, 3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Ph), 7.52 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Tolyl), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 194.1, 176.9, 170.1, 167.6, 158.0, 132.7, 132.2, 131.9, 130.9, 130.4, 129.3, 128.4, 127.9, 125.3, 119.4, 119.3, 116.4, 113.5, 96.8, 95.0, 94.5, 24.2.
Schmelzpunkt:	268.5 °C
ESI-MS:	m/z = 503.5 [M+H] ⁺ , 525.5 [M+Na] ⁺ , 541.4 [M+NH ₄ +Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 74.08, H 4.41, N 5.57, S 6.38 Gef.: C 73.72, H 4.42, N 5.51, S 6.36

(Z)-5-(4-(4-Benzoylphenoxy)benzyliden)-2-*p*-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1701 (398))

Eine Mischung aus 276 mg Tolunitril (**337**) (2.35 mmol, 1.0 eq), 711 mg 4-(4-Benzoylphenoxy)benzaldehyd (**397**) (2.35 mmol, 1.0 eq), 164 μL Thioglykolsäure (**335**) (2.35 mmol, 1.0 eq) und 2.5 mL Triethylamin wird für 30 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

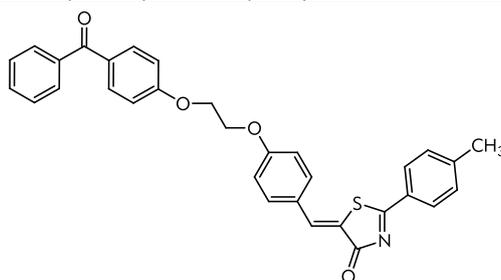
Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (9:1) aufgereinigt, wobei 355 mg (50%) des Edukt **386** zurückgewonnen werden konnten.

Das Lösungsmittel des Filtrats wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert um weitere Produkt zu isolieren.

8.2.6 Synthese der zum kovalent Labeling fähigen Aryl-Aryl-Thiazolone

Ausbeute:	49 mg + 74 mg (Säule + Umkristall. = 11%)
Summenformel:	C ₃₀ H ₂₁ NO ₃ S*0.5 H ₂ O
Molmasse:	475.56 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL723, ST-1701
R _F -Wert:	0.15 (Hex/EE 9:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.11 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-Tolyl), 8.06 (s, 1H, -CH-), 7.91 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Ph), 7.84 8.11 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-OPh-CH=), 7.77-7.84 (m, 7H, 3H,5H-Benzamid + 7.83-7.65 (m, 5H, 3H,4H,5H-Ph + 2H,3H,5H,6H-(CO)-Ph-O-), 7.33 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.52 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-OPh-CH=), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 194.4, 185.9, 182.0, 159.3, 157.7, 146.6, 137.1, 136.5, 132.8, 132.5, 132.4, 132.2, 130.1, 129.3, 129.3, 128.5, 128.4, 128.4, 125.3, 119.8, 118.4, 21.3.
Schmelzpunkt:	158 °C
ESI-MS:	m/z = 476.22 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 74.36, H 4.58, N 2.89, S 6.62 Gef.: C 74.49, H 4.68, N 2.69, S 6.86

(Z)-5-(4-(2-(4-Benzoylphenoxy)ethoxy)benzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1695 (401))



Eine Suspension aus 80 mg 2-*p*-Tolylthiazol-4(5*H*)-on (**339**) (0.42 mmol, 1.0 eq), 127 mg 4-(2-(4-Benzoylphenoxy)ethoxy)benzaldehyd (**400**) (0.37 mmol, 0.88 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 3.5 mL MeOH wird 5 min in der Mikrowelle auf 90 °C erhitzt.

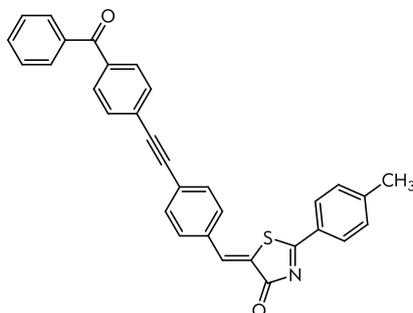
Die Reaktionssuspension wird abgesaugt und mit Methanol nachgewaschen.

Ausbeute:	126 mg (66%)
Summenformel:	C ₃₂ H ₂₅ NO ₄ S*0.4 H ₂ O
Molmasse:	519.61 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL679, ST-1695
R _F -Wert:	0.40 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.12 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 8.02 (s, 1H, -CH-), 7.87-7.65 (m, 6H, 3H,5H-Tolyl + 2H,6H-(CO)-Ph-O- + 2H,6H-Ph), 7.58-7.45 (m, 3H, 4H-Ph + 2H,6H-OPh-CH=), 7.37 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Ph), 7.01-7.10 (m, 4H, 3H,5H-(CO)-Ph-O- + 3H,5H-OPh-CH=), 4.45 (s, 4H, O-(CH ₂) ₂ -O), 2.48 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 195.4, 186.4, 183.5, 162.0, 160.8, 146.4, 138.2, 137.8, 132.7, 132.6, 132.0, 130.8, 129.9, 129.7, 129.40, 128.9, 128.2, 127.2, 124.3, 115.5, 114.2, 77.5, 77.0, 76.5, 66.6, 66.5, 22.0.
Schmelzpunkt:	217 °C
ESI-MS:	m/z = 520.7 [M+H] ⁺ , 542.8 [M+Na] ⁺
MALDI-HRMS:	Ber.: m/z = 520.15771 [M+H] ⁺ Gef.: m/z = 520.15760 [M+H] ⁺ (Δ: 0.2 ppm)

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

CHN: Ber.: C 72.96, H 4.94, N 2.66 S 6.09
 Gef.: C 72.85, H 4.69, N 2.52, S 6.30

(Z)-5-(4-((4-Benzoylphenyl)ethynyl)benzyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on
 (ST-1743, (406))



Eine Mischung aus 61 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.32 mmol, 1.0 eq), 100 mg 4-((4-Benzoylphenyl)ethynyl)benzaldehyd (**405**) (0.32 mmol, 1.0 eq) in 4 mL abs. Methanol und drei Tropfen Piperidin wird für 10 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Die ockerfarbene Suspension wird abgesaugt und mit etwas Methanol nachgewaschen.

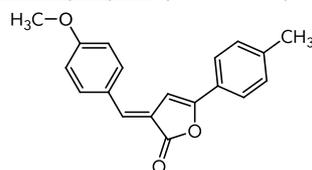
Ausbeute: 123 mg (79%)
 Summenformel: $C_{32}H_{21}NO_2S \cdot 0.5 H_2O$
 Molmasse: 483.58 g/mol
 Aussehen: gelber Feststoff
 Bezeichnung: AL795, ST-1743
 R_f -Wert: 0.33 (Hex/EE 2:1)
 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.13$ (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 8.03 (s, 1H, -CH-), 7.84-7.79 (m, 4H, 2H,6H-(CO)-Ph- + 2H,6H-Ph), 7.68-7.48 (m, 9H, 3H,5H-Tolyl + 2H,6H-OPh-CH= + 3H,4H,5H-Ph + 3H,5H-(CO)-Ph), 7.38 (d, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, 2H,6H-Ph-CH=), 2.49 (s, 3H, -CH₃).
 ^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 195.4, 186.4, 183.5, 162.0, 160.8, 146.4, 138.2, 137.8, 132.7, 132.6, 132.0, 130.8, 129.9, 129.7, 129.40, 128.9, 128.2, 127.2, 124.3, 115.5, 114.2, 77.5, 77.0, 76.5, 66.6, 66.5, 22.0$.
 Schmelzpunkt: 255.2 °C (Sublimation)
 ESI-MS: $m/z = 483.23 [M+H]^+, 506.29 [M+Na]^+$
 CHN: Ber.: C 78.03, H 4.50, N 2.84, S 6.51
 Gef.: C 78.27, H 4.39, N 2.63, S 6.75

8.2.7 Synthese der C06 Derivate

8.2.7.1 Synthese der Derivate mit variiertem Kern

8.2.7.1.1 Synthese des Furan- und Pyrrol-C06-Analogons

(E)-3-(4-Methoxybenzyliden)-5-p-tolylfuran-2(3H)-on (ST-1501 (409))



Methode 1: nach^[372]

Eine Mischung aus 473 mg 4-Oxo-4-p-tolylbutansäure (**407**) (2.47 mmol, 1.0 eq), 0.3 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (2.47 mmol, 1.0 eq) und 202 mg frisch entwässertes Natriumacetat (2.47 mmol, 1.0 eq) in 7 mL Essigsäureanhydrid wird für 2 Stunden zum Sieden erhitzt.

Die schwarze Reaktionsmischung wird auf ca. 50 mL Wasser gegeben und mit ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wird dreimal mit je ca. 250 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigen organischen Phasen werden einmal mit ca. 600 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das ölige schwarze Rohprodukt wird aus EtOH umkristallisiert.

Methode 2:

Zu einer Lösung aus 150 mg 5-p-Tolylfuran-2(3H)-on (**408**) (0.86 mmol, 1.0 eq), 105 µL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (0.86 mmol, 1.0 eq) in 2 mL abs. MeOH werden bei Raumtemperatur 35 µL Piperidin (0.86 mmol, 1.0 eq) gegeben und die Mischung wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe des Piperidins wird die Lösung sofort gelb und ein Feststoff fällt aus.

Die hellgelbe Suspension wird abgesaugt und mit etwas MeOH nachgewaschen.

Aus dem Filtrat wird weiteres Produkt auskristallisiert.

Methode 3:

Zu einer Lösung aus 250 mg 5-p-Tolylfuran-2(3H)-on (**408**, (1.44 mmol, 1.0 eq), 175 µL 4-Methoxybenzaldehyd, **336**, (1.44 mmol, 1.0 eq) in 3 mL abs. MeOH werden bei 0 °C 29 µL Piperidin (0.92 mmol, 0.2 eq) gegeben und die Mischung wird für 15 min bei 0 °C gerührt. Durch Zugabe des Piperidins wird die Lösung sofort gelb und ein Feststoff fällt aus.

Die hellgelbe Suspension wird abgesaugt und mit etwas MeOH nachgewaschen.

Aus dem Filtrat wird weiteres Produkt auskristallisiert.

Ausbeute: Methode 1: 124 mg (17%)

Methode 2: 56 mg (22%)

Methode 3: 185 mg (44%)

Summenformel: C₁₉H₁₆O₃

Molmasse: 292.33 g/mol

Aussehen: gelber Feststoff

Bezeichnung: AL490, ST-1501

R_F-Wert: 0.76 (Hex/EE 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.88 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.77 (d, 2H, ³J = 8.1 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.56 (s, 1H, -CH-), 7.35-7.32 (m, 3H, 4H-Furan + 2H,6H-Tolyl), 7.07 (d, 2H, ³J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.86 (s, 3H, -OCH₃), 2.37 (s, 3H, -CH₃).

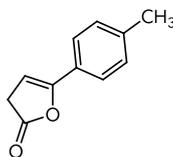
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 169.9, 161.3, 156.2, 140.6, 134.8, 132.0, 129.6, 128.1, 125.6, 125.2, 123.2, 114.7, 99.1, 55.5, 21.5.

Schmelzpunkt: 164,9 °C

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

ESI-MS:	$m/z = 293.1 [M+H]^+$
CHN:	Ber.: C 78.06, H 5.52
	Gef.: C 78.05, H 5.52

5-p-Tolylfuran-2(3H)-on (408)^[373]

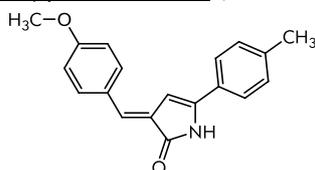


Eine Mischung aus 1.00 g 4-Oxo-4-p-tolylbutansäure (**407**) (5.20 mmol, 1.0 eq) und 20 ml Acetylchlorid (280 mmol, 54 eq) wird für 15 min zum Sieden erhitzt.

Das überschüssige Acetylchlorid wird im Vakuum entfernt und der Rückstand aus wenig Et₂O umkristallisiert. Das Rohprodukt wird dreimal in Et₂O suspendiert und das Lösemittel abkanüliert.

Ausbeute:	775 mg (86%)
Summenformel:	C ₁₁ H ₁₀ O ₂
Molmasse:	174.20 g/mol
Aussehen:	blass gelber Feststoff
R _F -Wert:	0.60 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	$\delta = 7.50$ (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.21 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 5.72 (t, 1H, ³ J = 2.6 Hz, -CH-), 3.40 (d, 2H, ³ J = 2.5 Hz, -CH ₂ -), 2.38 (s, 3H, -CH ₃).
ESI-MS:	$m/z = 172.9 [M-H]^-$, $252.7 [M+AcCl]^-$

(E)-3-(4-Methoxybenzyliden)-5-p-tolyl-1H-pyrrol-2(3H)-on (ST-1636 (410))^{nach [374]}



Eine Mischung aus 152 mg (E)-3-(4-Methoxybenzyliden)-5-p-tolylfuran-2(3H)-on, **ST-1501 (409)**, (0.52 mmol, 1.0 eq), 150 mg aktiviertes 4Å Molsieb und 15 mL über CaCl₂ getrocknetes, mit Ammoniak gesättigtes EtOH wird für 5 min mit Ammoniak begast und dann für 24 Stunden bei Raumtemperatur im verschlossenen Vial gerührt. Nach 16 Stunden werden weitere 5 mL mit Ammoniak gesättigtes EtOH zu gegeben.

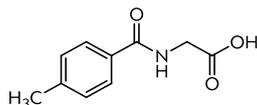
Das Lösungsmittel der klaren Reaktionsmischung wird im Vakuum entfernt und der ölige, rot-orangen Rückstand wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	128 mg (85%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₇ NO ₂ * 0.4 H ₂ O
Molmasse:	291.34 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL534, ST-1636
R _F -Wert:	0.40 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	$\delta = 10.43$ (br s, 1H, -NH-), 7.78 (p t, 4H, 2H,6H-PhOMe + 3H,5H-Tolyl), 7.27 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.10 (s, 1H, -CH-), 7.02 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 6.82 (s, 1H, 4H-Pyrrol), 3.83 (s, 3H, -OCH ₃), 2.35 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	$\delta = 172.1$, 160.8 , 143.7 , 139.8 , 132.1 , 132.0 , 129.7 , 129.1 , 128.8 , 127.2 , 124.9 , 114.5 , 97.1 , 55.4 , 21.4 .

8.2.7.1 Synthese der Derivate mit variiertem Kern

<i>Schmelzpunkt:</i>	203 °C
<i>ESI-MS:</i>	$m/z = 292.6 [M+H]^+$, $314.4 [M+Na]^+$
<i>MALDI-HRMS:</i>	Ber.: $m/z = 292.13321 [M+H]^+$ Gef.: $m/z = 292.13310 [M+H]^+$ (Δ : 0.3 ppm)
<i>CHN:</i>	Ber.: C 76.44, H 6.01, N 4.69 Gef.: C 76.75, H 6.09, N 4.45

8.2.7.1.2 Synthese des Oxazol- und Imidazol-CO6-Analogons

2-(4-Methylbenzamido)essigsäure (413) ^{nach^[375]}

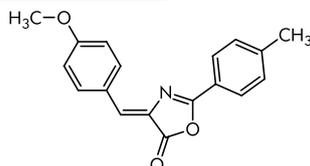
Eine Mischung aus 5.00 g 4-Methylbenzoesäure (**411**) (36.72 mmol, 1.0 eq) in 10 mL Thionylchlorid (137 mmol, 3.8 eq) wird für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt (**412**) wird portionsweise zu einer 80 °C warmen Lösung aus 2.76 g Glycin (36.72 mmol, 1.0 eq), 2.94 g NaOH (73.45 mmol, 2.0 eq) in 20 mL Wasser gegeben und dann für 30 min bei 80 °C gerührt.

Die Mischung wird bei 0 °C mit konz. HCl auf pH 1 gebracht, wobei sich ein weißer Feststoff bildet. Die Suspension wird mit Wasser verdünnt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Das Rohprodukt wird aus EtOH umkristallisiert und säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und MeOH (95:5) weiter aufgereinigt oder aus MeOH und Wasser weiterumkristallisiert.

Ausbeute:	1.75 g (25%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃
Molmasse:	193.20 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.15 (DCM/MeOH 9:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 12.56 (br s, 1H, -COOH), 8.74 (t, 1H, ³ J = 5.8 Hz, -NH-), 7.77 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.28 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 3.90 (d, 2H, ³ J = 5.9 Hz, -CH ₂ -), 2.36 (s, 3H, -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 191.11 [M-H] ⁻

(Z)-4-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolyloxazol-5(4H)-on (ST-1745 (414)) ^[376]

Eine Mischung aus 658 mg 2-(4-Methylbenzamido)essigsäure (**413**) (3.41 mmol, 1.0 eq), 0.4 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (3.41 mmol, 1.0eq) in 3 mL Essigsäureanhydrid wird für 50 min auf 100 °C erwärmt.

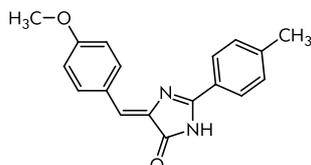
Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die feste, orange Mischung in ca. 5 mL EtOH suspendiert und drei Stunden im Kühlschrank stehen gelassen. Der Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen. Aus dem Filtrat kann weiteres Produkt durch Umkristallisieren aus EtOH isoliert werden.

Ausbeute:	393 mg (39%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃
Molmasse:	293.32 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL763, ST-1745
R _F -Wert:	0.50 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.29 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 8.00 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.44 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.30 (s, 1H, -CH-), 7.11 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.86 (s, 3H, -OCH ₃), 2.43 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 167.0, 161.9, 161.7, 143.9, 134.3, 130.6, 130.5, 129.8, 127.7, 126.1, 122.4, 114.6, 55.4, 21.2.
Schmelzpunkt:	186 °C

8.2.7.1 Synthese der Derivate mit variiertem Kern

ESI-MS:	m/z = 294.3 [M+H] ⁺ , 316.4 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 73.71, H 5.15, N 4.78 Gef.: C 73.62, H 5.06, N 4.65

(Z)-4-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolyl-1H-imidazol-5(4H)-on (ST-1746 (415))^{nach[377]}

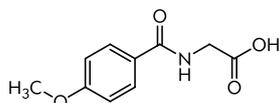


Eine Suspension aus 100 mg (Z)-4-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolylloxazol-5(4H)-on, **ST-1745 (414)**, (0.34 mmol, 1.0 eq) in 10 mL MeOH, 10 mL 25%igen Ammoniak und 43 mg Na₂CO₃ (0.41 mmol, 1.2 eq) wird für 15 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Methanol wird im Vakuum entfernt und die orangene Suspension wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Ausbeute:	15 mg (15%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂ * 0.25 H ₂ O
Molmasse:	292.33 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL801/AL804, ST-1746
R _F -Wert:	0.34 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.89 (s, 1H, -NH-), 8.28 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.97 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.36 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.19 (s, 1H, -CH-), 7.00 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.89 (s, 3H, -OCH ₃), 2.46 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 172.3, 160.3, 158.9, 141.7, 138.5, 133.3, 128.8, 126.9, 126.7, 125.1, 124.8, 113.6, 54.6, 20.9.
Schmelzpunkt:	260 °C (Sublimation)
ESI-MS:	m/z = 290.9 [M-H] ⁻
CHN:	Ber.: C 72.83, H 5.60, N 9.44 Gef.: C 72.60, H 5.40, N 9.28
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 293.12845 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 293.12869 [M+H] ⁺ (Δ: 0.8 ppm)

2-(4-Methoxybenzamido)essigsäure (416)^{nach[375]}



Eine Mischung aus 2.00 g 4-Methoxybenzoesäure (**192**) (13.15 mmol, 1.0 eq) in 5 mL Thionylchlorid (68.90 mmol, 5.2 eq) wird für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt (**193**) wird portionsweise zu einer 80 °C warmen Lösung aus 0.99 g Glycin (13.15 mmol, 1.0 eq), 1.05 g NaOH (26.3 mmol, 2.0 eq) in 10 mL Wasser gegeben und dann für 30 min bei 80 °C gerührt.

Die Mischung wird bei 0 °C mit konz. HCl auf pH 1 gebracht, wobei sich ein weißer Feststoff bildet. Die Suspension wird mit Wasser verdünnt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

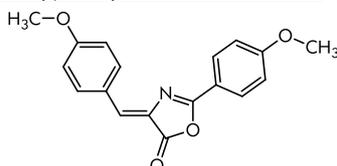
Das Rohprodukt wird als 1:1.5 Mischung (Produkt zu Edukt) weiter umgesetzt.

Ausbeute:	2.13 g („31%“)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄
Molmasse:	209.20 g/mol

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Aussehen: weißer Feststoff
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.61 (br s, 2H, 2 x -COOH), 8.67 (t, 1H, ³J = 5.8 Hz, -NH-), 7.89 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3H,5H-Benzoessäure), 7.85 (d, 2H, ³J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.04-6.98 (m, 4H, 2H,6H-Benzoessäure + 2H,6H-Tolyl), 3.89 (d, 2H, ³J = 5.9 Hz, -CH₂-), 3.82 (3H, Benzoessäure-OCH₃), 3.81 (3H, -OCH₃).

(Z)-4-(4-Methoxybenzyliden)-2-(4-methoxyphenyl)oxazol-5(4H)-on (ST-1744 (417))^[376]

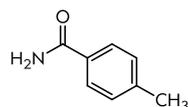


Eine Mischung aus 947 mg 2-(4-Methoxybenzamido)essigsäure (**416**) (4.52 mmol, 1.1 eq), 0.5 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (4.11 mmol, 1.0eq) in 2 mL Essigsäureanhydrid wird für 45 min auf 100 °C erwärmt.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die feste, orange Mischung in ca. 5 mL EtOH suspendiert. Der Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen.

Ausbeute: 252 mg (20%)
Summenformel: C₁₈H₁₅NO₄
Molmasse: 309.32 g/mol
Aussehen: gelber Feststoff
Bezeichnung: AL758, ST-1744
R_f-Wert: 0.61 (Hex/EE 1:1)
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.29 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2H,6H-Benzyliden), 8.06 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.25 (s, 1H, -CH-), 7.18 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 7.11 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3H,5H-Benzyliden), 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 3.85 (s, 3H, Benzyliden-OCH₃).
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 167.2, 163.4, 161.7, 161.7, 134.3, 130.9, 129.9, 129.7, 126.3, 117.4, 114.9, 114.6, 55.7, 55.5.
Schmelzpunkt: 191.7 °C (Sublimation)
ESI-MS: m/z = 310.3 [M+H]⁺
CHN: Ber.: C 69.89, H 4.89, N 4.53
Gef.: C 69.68, H 4.80, N 4.42

8.2.7.1.3 Synthese des Oxi-C06-Analogons ((Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolyloxazol-4(5H)-on) 4-Methylbenzamid (418)



Methode 1:^[379]

Eine Mischung aus 2.10 g 4-Methylbenzoesäure (**411**) (15.4 mmol, 1.0 eq) in 10 mL Thionylchlorid (143 mmol, 9.3 eq) wird für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt (**401**) wird portionsweise zu 10 mL einer 0 °C kalten 25%igen Ammoniak-Lösung gegeben und für 10 min bei 0 °C gerührt.

Der entstandene weiße Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Methode 2:

Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 2.38 g 4-Methylbenzoesäure (**411**) (17.48 mmol, 1.0 eq) in 40 mL abs. THF und 0.15 mL abs. DMF werden 1.50 mL Oxalylchlorid (22.73 mmol, 1.3 eq) langsam zugetropft. Die klare, bläuliche Lösung wird für 60 min bei Raumtemperatur gerührt und dann 20 min bei 40 °C.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand (**412**) in 10 mL DMF aufgenommen und zu einer 0 °C kalten Mischung aus 50 mL mit Ammoniak gesättigtem Dioxan und 5 mL THF zu getropft. Die Mischung wird dann bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. THF und Dioxan werden im Vakuum entfernen und die DMF Suspension auf ca. 50 mL Eiswasser geben, abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

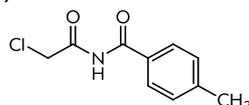
Methode 3:^[380]

Zu einer Lösung aus 2.90 g *p*-Tolynitril (**337**) (24.76 mmol, 1.0 eq) in 13 mL abs. EtOH werden 2 mL 25%ige NaOH (24.76 mmol, 1.0 eq) und 12 mL 30%iges H₂O₂ (88.19 mmol, 3.6 eq) gegeben, wobei eine lebhaft Gasentwicklung und exotherme Reaktion zu beobachten ist. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden erneut 2 mL NaOH und 12 mL H₂O₂ dazugegeben. Die Mischung wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das EtOH wird im Vakuum entfernt und es werden ca. 20 mL Wasser zugesetzt. Die Mischung wird zweimal mit je ca. 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	<u>Methode 1:</u> 2.09 g (quant.) <u>Methode 2:</u> 1.82 g (77%) <u>Methode 3:</u> 3.35 g (quant.)
Summenformel:	C ₈ H ₉ NO
Molmasse:	135.16 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _f -Wert:	0.38 (DCM/MeOH 95:5)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 7.88 (br s, 1H, -NHH), 7.78 (d, 2H, ³ J = 8.4 Hz, 2H,6H-Benzoesäure), 7.26-7.23 (p d, 3H, -NHH + 3H,5H-Benzoesäure), 2.34 (3H, -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 136.13 [M+H] ⁺ , 158.13 [M+Na] ⁺

N-(2-Chloracetyl)-4-methylbenzamid (419) nach^[381]



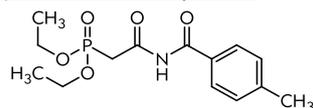
1.65 g 4-Methylbenzamid (**418**) (12.21 mmol, 1.0 eq) werden unter Argon mit 2.5 mL Chloroacetylchlorid (31.43 mmol, 2.6 eq) für 50 min auf 110 °C erwärmt.

Der Überschuss Chloroacetylchlorid wird im Vakuum entfernt und der grau-braune Rückstand wird in ca. 35 mL Et₂O suspendiert, homogenisiert, abgesaugt und mit etwas Et₂O nachgewaschen.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Ausbeute:	2.26 g (87%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₀ ClNO ₂
Molmasse:	211.65 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.53 (DCM/MeOH 98:2)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 11.35 (s, 1H, -NH-), 7.85 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Benzamid), 7.33 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Benzamid), 4.77 (s, 2H, -CH ₂ Cl), 2.38 (3H, -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 249.13 [M+Cl] ⁻

2-(4-Methylbenzamido)-2-oxoethylphosphonsäurediethylester (420) ^{nach[381]}

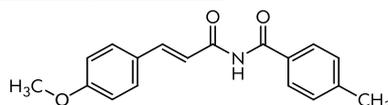


Eine Mischung aus 1.86 g *N*-(2-Chloracetyl)-4-methylbenzamid (**419**) (8.80 mmol, 1.0 eq) und 4.00 mL Triethylphosphit (20.70 mmol, 2.4 eq) wird für 1 Stunden auf 150 °C erwärmt.

Die auf Raumtemperatur abgekühlte Mischung wird dreimal mit je ca. 10 mL Hexan gemischt und die Hexanschicht abkanüliert.

Ausbeute:	2.60 g (95%)
Summenformel:	C ₁₄ H ₂₀ NO ₅ P
Molmasse:	313.29 g/mol
Aussehen:	gelb-braunes Öl
R _F -Wert:	0.09 (DCM/MeOH 98:2)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.60 (s, 1H, -NH-), 7.82 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-Benzamid), 7.29 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Benzamid), 4.25-4.13 (m, 4H, 2 x -CH ₂ -CH ₃), 3.47 (d, 2H, ² J _{H,P} = 21.3 Hz, -CH ₂ -P), , 2.42 (s, 3H, -CH ₃), 1.33 (t, 6H, ³ J = 7.0 Hz, 2 x -CH ₂ -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 314.23 [M+H] ⁺ , 336.22 [M+Na] ⁺

(E)-N-(3-(4-Methoxyphenyl)acryloyl)-4-methylbenzamid (421) ^{nach[381]}



Eine Mischung aus 1.23 g 2-(4-Methylbenzamido)-2-oxoethylphosphonsäurediethylester (**420**) (3.93 mmol, 1.0 eq), 0.6 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (3.93 mmol, 1.0 eq) und 0.47 mL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (3.93 mmol, 1.0 eq) in 10 mL THF wird unter Argon für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. (Wird die Reaktion nach 4.5 Stunden aufgearbeitet, werden ca. 20% weniger Produkt isoliert)

Die Reaktionslösung wird mit ca. 100 mL Ethylacetat und 50 mL Wasser versetzt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je ca. 75 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ca. 200 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt

Das Rohprodukt wird aus EtOH umkristallisiert, wobei aus dem Filtrat weiter Produkt auskristallisiert werden kann.

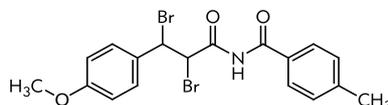
Ausbeute:	0.89 g (77%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃
Molmasse:	295.33 g/mol
Aussehen:	weißliche Nadeln
R _F -Wert:	0.70 (DCM/MeOH 95:5)

8.2.7.1 Synthese der Derivate mit variiertem Kern

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.95$ (s, 1H, -NH-), 7.86 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 2H,6H-Benzamid), 7.71-7.61 (m, 3H, -CH=CH-PhOMe + 3H,5H-PhOMe), 7.34 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, 3H,5H-Benzamid), 7.22 (d, 1H, $^3J = 15.8$ Hz, -CH=CH-PhOMe), 7.02 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2H,6H-PhOMe), 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 2.39 (s, 3H, -CH₃).

ESI-MS: $m/z = 296.20$ [M+H]⁺, 318.16 [M+Na]⁺

N-(2,3-Dibrom-3-(4-methoxyphenyl)propanoyl)-4-methylbenzamid (422)



Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 450 mg (*E*)-*N*-(3-(4-Methoxyphenyl)acryloyl)-4-methylbenzamid (**421**) (1.524 mmol, 1.0 eq) in 20 mL Dichlormethan werden tropfenweise 3.05 mL einer 0.5M Brom-Lösung in Dichlormethan (1.524 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Die Mischung wird für 20 min bei Raumtemperatur gerührt.

Die klare Lösung wird mit ca. 75 mL ges. Na₂S₂O₃-Lösung versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige einmal mit ca. 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 672 mg (97%)

Summenformel: C₁₈H₁₇Br₂NO₃

Molmasse: 455.14 g/mol

Aussehen: gelblicher Schaum

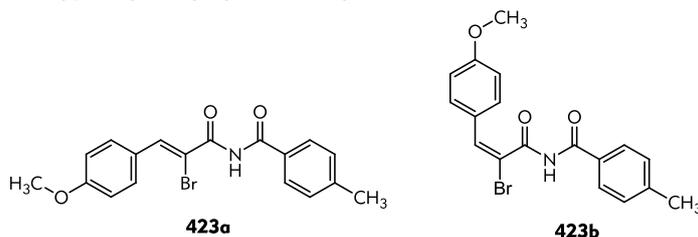
R_F-Wert: 0.59 (Hex/EE 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.46$ (s, 1H, -NH-), 7.87 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 2H,6H-Benzamid), 7.48 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, 3H,5H-PhOMe), 7.40 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, 3H,5H-Benzamid), 6.99 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, 2H,6H-PhOMe), 5.90 (d, 2H, $^3J = 11.6$ Hz, -CHBr-CHBr-PhOMe), 5.68 (d, 2H, $^3J = 11.8$ Hz, -CHBr-CHBr-PhOMe), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 2.41 (s, 3H, -CH₃).

ESI-MS: $m/z = 532.5$, 534.6, 536.5 [M-H]⁻,
612.6, 614.6, 616.6 [M+Br]⁻

(Z)-N-(2-Brom-3-(4-methoxyphenyl)acryloyl)-4-methylbenzamid (423a) und

(E)-N-(2-Brom-3-(4-methoxyphenyl)acryloyl)-4-methylbenzamid (423b) ^{nach[378]}



Zu einer Lösung aus 1.45 g *N*-(2,3-Dibrom-3-(4-methoxyphenyl)propanoyl)-4-methylbenzamid (**422**) (3.19 mmol, 1.0 eq) in 15 mL abs. Dichlormethan werden 4.4 mL Triethylamin (31.86 mmol, 10.0 eq) gegeben. Die Mischung wird für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionsmischung wird mit ca. 50 mL CHCl₃ versetzt und zweimal mit je ca. 50 mL 2M HCl und einmal mit ca. 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das ölige Rohprodukt wird aus MeOH umkristallisiert um **423a** zu isolieren.

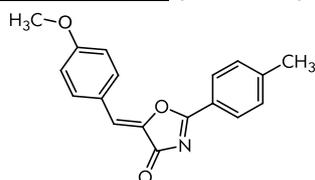
Durch säulenchromatographische Trennung mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (4:1) wird **423b** und weiteres **423a** isoliert.

Die Identität von **423a** und **423b** wurde jeweils durch ¹³C-, NOESY-, HSQC- und HMBC-Spektren bestätigt.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

<i>Ausbeute:</i>	423a: 583 mg (49%) 423b: 385 mg (32%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₁₆ BrNO ₃
<i>Molmasse:</i>	374.23 g/mol
<i>Aussehen:</i>	423a: hell-gelber Feststoff 423b: gelb-orangener, gläserner Feststoff
<i>R_f-Wert:</i>	423a: 0.22 (Hex/EE 3:1) 423b: 0.29 (Hex/EE 3:1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	423a: δ = 11.16 (s, 1H, -NH-), 8.02 (s, 1H, -CHBr-), 7.93 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PheOMe), 7.38 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Benzamid), 7.34 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Benzamid), 7.07 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 3.82 (s, 3H, -OCH ₃), 2.29 (s, 3H, -CH ₃). 423b: δ = 11.63 (s, 1H, -NH-), 7.73 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Benzamid), 7.31 (pq, 4H, 3H,5H-PheOMe + 3H,5H-Benzamid), 7.19 (s, 1H, -CHBr-), 6.93 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 3.75 (s, 3H, -OCH ₃), 2.38 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆):	423a: δ = 166.8, 164.5, 160.7, 143.1, 137.9, 132.1, 130.6, 129.0, 128.7, 125.8, 114.0, 113.7, 55.4, 21.1. 423b: δ = 166.3, 165.8, 159.6, 143.7, 133.5, 129.4, 129.3, 129.1, 128.6, 127.0, 114.2, 111.3, 55.2, 21.1.
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 374.13, 376.14 [M+H] ⁺ , 396.12, 398.10 [M+Na] ⁺

(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-p-tolyloxazol-4(5H)-on (ST-1750 (424)) nach^[378]



Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 18 mg 60%igem Natriumhydrid (0.44 mmol, 1.10 eq) in 20 mL Dimethoxyethan werden 150 mg (Z)-N-(2-Brom-3-(4-methoxyphenyl)acryloyl)-4-methylbenzamid (**423a**) (0.4 mmol, 1.0 eq) gegeben. Die Mischung wird für 17 Stunden, ohne Schutzgas, zum Sieden erhitzt. Nach sechs Stunden wird ein weiteres Equivalent Natriumhydrid zugegeben.

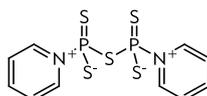
Das Lösungsmittel der roten Reaktionsmischung wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in 50 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus MeOH umkristallisiert, in Et₂O suspendiert und abgesaugt.

<i>Ausbeute:</i>	38 mg (32%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃ * 0.25 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	293.32 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelber Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL830, ST-1750
<i>R_f-Wert:</i>	0.25 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.21 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.98 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.52 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.13 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 7.09 (s, 1H, -CH-), 3.86 (s, 3H, -OCH ₃), 2.48 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 178.0, 177.1, 161.3, 146.6, 138.6, 133.6, 130.2, 129.6, 124.0, 121.8, 115.8, 114.9, 55.5, 21.6.

8.2.7.1 Synthese der Derivate mit variiertem Kern

<i>Schmelzpunkt:</i>	212.8 °C
<i>ESI-MS:</i>	$m/z = 294.5 [M+H]^+$, $316.3 [M+Na]^+$, $608.9 [M+Na]^{2+}$
<i>CHN:</i>	Ber.: C 72.59, H 5.25, N 4.70 Gef.: C 72.51, H 5.13, N 4.57
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: $m/z = 294.11247 [M+H]^+$ Gefunden: $m/z = 294.11276 [M+H]^+$ (Δ : 1.0 ppm)

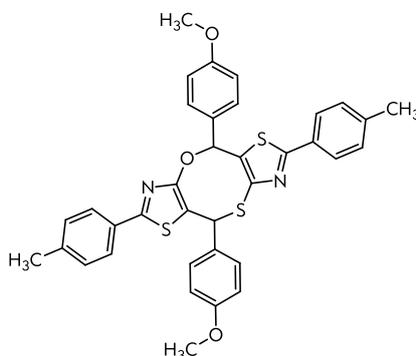
8.2.7.1.4 Synthese von Thion-C06

Phosphorpentasulfid-Pyridin-Komplex (426)^[389]

Zu 70 mL 80 °C warmen Pyridin (869 mmol, 77 eq) werden portionsweise 5 g Phosphorpentasulfid (22.5 mmol, 1.0 eq) gegeben. Die fast klare Lösung wird für eine Stunde zum Sieden erhitzt.

Die orange-rote Lösung wird auf Raumtemperatur gekühlt und dann über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene gelbe Feststoff wird abgesaugt und mit Acetonitril nachgewaschen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Ausbeute:	3.88 g (91%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ P ₂ S ₅
Molmasse:	380.48 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff

C06*(S)C06 (428) nach ^[389]

Eine Suspension aus 150 mg **C06 (182)** (0.48 mmol, 1.10 eq) und 55 mg Phosphorpentasulfid-Pyridin-Komplex (**426**) (0.15 mmol, 0.3 eq) in 3 mL abs. MeCN wird für 30 Minuten zum Sieden erhitzt.

Die Hälfte des Lösungsmittels wird im Vakuum entfernt. Es werden ca. 3 mL Wasser hinzugegeben und die Suspension wird 30 min. bei Raumtemperatur gerührt, bevor, der Feststoff abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen wird.

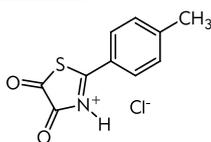
Ausbeute:	117 mg (76%)
Summenformel:	C ₃₆ H ₃₀ N ₂ O ₃ S ₃
Molmasse:	634.83 g/mol
Aussehen:	hellorangener Feststoff
Bezeichnung:	AL885
R _F -Wert:	0.48 (Hex/EE 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.93 (d, 2H, ³J = 8.3 Hz, 3H,5H-Tolyl_{(S)C06}), 7.79 (d, 2H, ³J = 8.19 Hz, 3H,5H-Tolyl_{C06}), 7.42 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe_{C06}), 7.27 (d, 2H, 2H,6H-Tolyl_{(S)C06}), 7.12 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl_{C06}), 7.09 (d, 2H, ³J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe_{(S)C06}), 6.90 (d, 2H, ³J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe_{(S)C06}), 6.69 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe_{(S)C06}), 5.20 (s, 1H, -SCH-), 4.64 (s, 1H, -OCH-), 3.83 (s, 3H, -OCH₃_{C06}), 3.70 (s, 3H, -OCH₃_{(S)C06}), 2.43 (s, 3H, -CH₃_{(S)C06}), 2.39 (s, 3H, -CH₃_{C06}).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆): δ = 193.0, 188.0, 168.4, 166.8, 159.9, 159.6, 159.6, 146.8, 146.7, 144.8, 141.0, 131.8, 131.8, 131.3, 131.3, 131.3, 130.3, 130.0, 129.8, 129.8, 129.8, 129.7, 129.7, 129.7, 129.7, 129.5, 129.3, 128.9, 128.9, 128.1, 126.4, 125.6, 124.5, 119.4, 113.9, 113.8, 113.8, 111.5, 111.5, 93.3, 73.8, 55.2, 55.2, 53.0, 45.7, 22.0, 21.5.

Schmelzpunkt:	184.0 °C (Sublimation)
ESI-MS:	m/z = 326.14 [M-C06] ⁺ , 635.22 [M+H] ⁺ , 657.21 [M+Na] ⁺

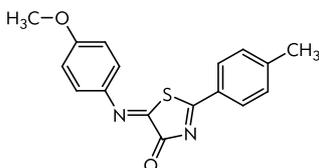
8.2.7.1.5 Synthese des Imino-C06 und dessen Derivaten

4,5-Dioxo-2-p-tolyl-4,5-dihydrothiazol-3-iumchlorid (429) nach[390,391]

Zu einer kalten 0 °C kalten Lösung aus 536 mg 4-Methylbenzothioamid (**340**)(3.55 mmol, 1.0 eq) in 6 mL abs. Aceton, die zuvor mit Argon entgast wurde, werden tropfenweise 0.3 mL Oxalylchlorid (1.32 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Nach einigen Tropfen bildet sich ein sonnengelber Niederschlag. Die Mischung wird noch ca. 10 min bei 0 °C gerührt.

Der entstandene, hydrolyseempfindliche Feststoff wird unter Argon abgesaugt und mit etwas Aceton nachgewaschen. Aus dem Filtrat kann weiteres Produkt isoliert werden.

Ausbeute:	663 mg (77%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₇ NO ₂ S ⁺ HCl
Molmasse:	206.3 g/mol + 35.45 g/mol
Aussehen:	sonnengelber, hydrolyseempfindlicher Feststoff
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 11.90 (s, 1H, ⁺ NH), 7.91 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.37 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-Tolyl), 2.39 (s, 3H, -CH ₃).
¹ H-NMR(400 MHz, DMSO-d ₆ + D ₂ O):	δ = 7.87 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.36 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 2.38 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 166.2, 164.7, 162.6, 144.1, 129.1, 128.6, 128.1, 21.0.
ESI-MS:	m/z = 216.14 [M+H] ⁺

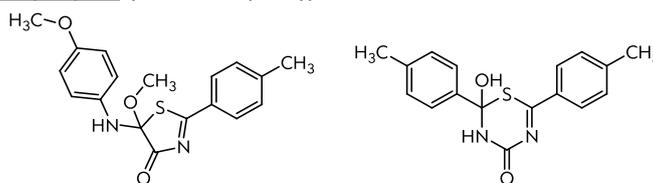
(Z)-5-(4-Methoxyphenylimino)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1693 (432)) nach[390,391]

Eine Lösung aus 75 mg 4,5-Dioxo-2-p-tolyl-4,5-dihydrothiazol-3-iumchlorid (**429**) (0.31 mmol, 1.0 eq) in 5 mL abs. Xylol (Isomerengemisch) wird auf 155 °C Ölbadtemperatur erhitzt und 5 min gerührt. Die Mischung wird dabei orangener, rötlicher und schließlich dunkelrot-violett. Dann wird die Lösung im Eisbad abgeschreckt und 49 mg Isocyano-4-methoxybenzol, **431**, (0.31 mmol, 1.0 eq) werden zugegeben. Die Mischung wird noch ca. 5 min bei Raumtemperatur gerührt und der Feststoff wird abgesaugt und mit etwas Xylol nachgewaschen.

Ausbeute:	78 mg (81%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S
Molmasse:	310.37 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL622, ST-1693
R _F -Wert:	0.48 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.13 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.51 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.40 (d, 2H, ³ J = 9.0 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.14 (d, 2H, ³ J = 9.0 Hz, 3H,5H-PhOMe), 7.09 (s, 1H, -CH-), 3.84 (s, 3H, -OCH ₃), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 194.6, 186.4, 159.7, 151.8, 131.4, 130.4, 129.1, 124.3, 123.7, 115.1, 113.9, 55.6, 21.6.
Schmelzpunkt:	199 °C
ESI-MS:	m/z = 311.18 [M+H] ⁺ , 333.12 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 65.79, H 4.55, N 9.03, S 10.33 Gef.: C 65.84, H 4.71, N 8.86, S 10.73

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

5-Methoxy-5-(4-methoxyphenylamino)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1690 (433)) und 2-Hydroxy-2,6-dip-tolyl-2H-1,3,5-thiadiazin-4(3H)-on (ST-1691 (434))



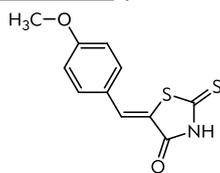
Eine Suspension aus 390 mg (Z)-5-(4-Methoxyphenylimino)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on, **ST-1693 (432)**, (0.31 mmol, 1.0 eq) in 15 mL MeOH wird für 30 min zum Sieden erhitzt. Der Feststoff (**ST-1691 (434)**) wird abgesaugt und das Lösemittel des Filtrats (**ST-1690 (433)**) im Vakuum entfernt. Die Struktur wurde jeweils durch eindeutige COESY- und NOESY-Spektren bestätigt

ST-1690 (433):

<i>Ausbeute:</i>	319 mg (81%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₃ S*0.25 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	342.41 g/mol
<i>Aussehen:</i>	orangener Schaum
<i>Bezeichnung:</i>	AL627 Fil, ST-1690
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 10.78 (s, 1H, NH), 7.25 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.15 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Tolyl), 6.89 (s, 4H, 2H,3H,5H,6H-PhOMe), 3.72 (s, 3H, -OCH ₃), 3.42 (s, 3H, -PhOCH ₃), 2.27 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 185.2, 159.0, 158.1, 139.2, 132.7, 129.0, 128.3, 128.3, 127.8, 126.2, 114.3, 114.3, 101.0, 55.3, 49.5, 20.7.
<i>Schmelzpunkt:</i>	96 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 343.3 [M+H] ⁺ , 365.3 [M+Na] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 62.32, H 5.38, N 8.07, S 9.24 Gef.: C 62.58, H 5.27, N 8.10, S 9.78
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: m/z = 343.11109 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 343.11111 [M+H] ⁺ (Δ: 0.1 ppm)

ST-1691 (434):

<i>Ausbeute:</i>	60 mg (10%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂ S*0.5 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	312.39 g/mol
<i>Aussehen:</i>	rosafarbender Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL627 FK, ST-1691
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 13.00 (s, 1H, -OH), 11.43 (s, 1H, NH), 7.93 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.77 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.34 (pq, 4H, 2H,3H,5H,6H-Ph _{NSOH} OMe), 2.40 (s, 3H, -Ph _{NSOH} CH ₃), 2.37 (s, 3H, -PhCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 201.2, 168.4, 149.2, 143.9, 142.6, 139.4, 129.2, 128.9, 128.5, 127.4, 21.1, 21.0..
<i>Schmelzpunkt:</i>	189.9 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 313.3 [M+H] ⁺ , 335.3 [M+Na] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 63.52, H 5.33, N 8.72, S 9.98 Gef.: C 63.50, H 5.05, N 8.74, S 10.09

8.2.7.1.6 Synthese von Amino-/Imino-Thiazolon-C06-Analoga**(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on (ST-1752 (436))****Methode 1:**^[392]

Eine Mischung aus 0.75 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (6.56 mmol, 1.0 eq), 0.87 g Rhodanin (**435**) (6.56 mmol, 1.0 eq), 1.61 g Natriumacetat (6.56 mmol, 1 eq) in 9 mL Essigsäure wird für 60 min auf 100 °C erhitzt.

Der gelben Suspension werden nach Abkühlen auf Raumtemperatur ca. 9 mL Wasser zugesetzt. Der gelbe Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Methode 2:^[393]

Eine Mischung aus 1 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (8.74 mmol, 1.0 eq), 1.19 g Rhodanin (**424**) (8.74 mmol, 1.0 eq) und 0.86 g Tetrabutylammoniumbromid (2.68 mmol, 0.3 eq) in 40 mL Wasser wird für 16 min auf 100 °C in der Mikrowelle (open vessel) erhitzt.

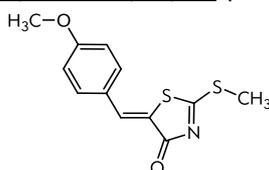
Das Lösungsmittel wird zur Hälfte im Vakuum entfernt und ca. 5 mL MeOH werden zugesetzt. Der gelbe Feststoff abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Methode 3:^[394]

Eine Mischung aus 1 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (8.74 mmol, 1.0 eq), 1.16 g Rhodanin (**435**) (8.74 mmol, 1.0 eq) und drei Tropfen Piperidine in 3 mL EtOH wird für 10 min auf 100 °C in der Mikrowelle erhitzt.

Der gelbe Feststoff wird in ca. 5 mL EtOH suspendiert, abgesaugt und mit Wasser und etwas EtOH nachgewaschen.

Ausbeute:	<u>Methode 1:</u> 0.82 g (50%) <u>Methode 2:</u> 1.31 g (59%) <u>Methode 3:</u> 2.00 g (91%)
Summenformel:	C ₁₁ H ₉ NO ₂ S ₂
Molmasse:	251.33 g/mol
Aussehen:	gelber, voluminöser Feststoff
Bezeichnung:	AL870, ST-1752
R _f -Wert:	0.48 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 13.76 (br s, 1H, -NH), 7.61 (s, 1H, -CH=), 7.57 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.11 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.83 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 195.4, 169.3, 161.2, 132.5, 131.7, 125.4, 122.2, 115.0, 55.4.
Schmelzpunkt:	254.7 °C (Sublimation)
ESI-MS:	m/z = 249.7 [M-H] ⁻
CHN:	Ber.: C 52.57, H 3.61, N 5.57, S 25.52 Gef.: C 52.41, H 3.60, N 5.52, S 25.32

(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(methylthio)thiazol-4(5H)-on (437)^[395]

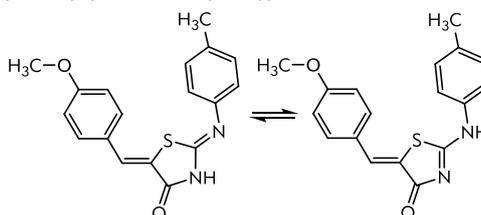
Eine Mischung aus 500 mg (Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on (**436**) (1.99 mmol, 1.0 eq), 0.2 mL Methyljodid (2.98 mmol, 1.5 eq) und 0.5 mL DIPEA (2.98 mmol, 1.5 eq) in 50 mL EtOH wird für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Der orangenen Suspension werden ca. 75 mL Wasser zugesetzt, woraufhin sich ein gelber voluminöser Feststoff bildet, der abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen wird.

Ausbeute:	342 mg (46%)
Summenformel:	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ S ₂
Molmasse:	265.35 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
R _F -Wert:	0.44 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 7.82 (s, 1H, -CH=), 7.64 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.12 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.84 (s, 3H, -OCH ₃), 2.82 (s, 3H, -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 266.3 [M+H] ⁺ , 288.4 [M+Na] ⁺

(Z)-5-(4-methoxybenzyliden)-2-(p-tolylamino)thiazol-4(5H)-on (438a) und (5Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(p-tolylimino)thiazolidin-4-on (438b) (ST-1751 (438))^[395]

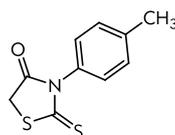


Eine Mischung aus 100 mg (Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-(methylthio)thiazol-4(5H)-on (**437**) (0.38 mmol, 1.0 eq), 40 mg 4-Aminotoluol (0.38 mmol, 1.0 eq) und 7 µL DIPEA (0.38 mmol, 1 eq) in 3 mL Dioxan wird für 20 min in der Mikrowelle auf 150 °C erhitzt. 4-Aminotoluol wurde aus dem Hydrochlorid durch stark basischen Ionentauscher freigesetzt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute:	82 mg (67%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₆ N ₂ O ₂ S*0.25 H ₂ O
Molmasse:	324.40 g/mol
Aussehen:	beiger Feststoff
Bezeichnung:	AL874 und AL875, ST-1751
R _F -Wert:	0.42 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 12.21 (br s, 1H, -NH ^b), 11.49 (br s, 1H, -NH ^a), 7.68-7.57 (m, 6H, -CH ^b = + -CH ^a = + 2H ^b ,6H ^b -PhOMe + 2H ^a ,6H ^a -PhOMe), 7.47 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H ^a ,6H ^a -Tolyl), 7.25-7.20 (m, 4H, 3H ^b ,5H ^b -PhOMe + 3H ^a ,5H ^a -PhOMe), 7.12 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H ^b ,6H ^b -Tolyl), 7.05 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H ^a ,5H ^a -Tolyl), 6.95 (d, 2H, ³ J = 7.9 Hz, 3H ^b ,5H ^b -Tolyl), 3.83 (s, 3H, -OCH ₃ ^b), 3.78 (s, 3H, -OCH ₃ ^a), 2.31 (s, 6H, -CH ₃ ^b + -CH ₃ ^a).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 160.4, 134.2, 134.1, 131.5, 130.1, 129.9, 129.5, 129.5, 129.4, 129.3, 129.3, 129.2, 129.2, 125.9, 125.9, 121.4, 121.4, 120.4, 120.4, 120.4, 114.8, 113.5, 113.5, 55.4, 55.4, 20.5.
Schmelzpunkt:	258 °C
ESI-MS:	m/z = 325.2 [M+H] ⁺ , 347.6 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 65.73, H 5.96, N 8.52, S 9.75 Gef.: C 65.46, H 4.86, N 8.31, S 9.98
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 325.10053 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 325.10064 [M+H] ⁺ (Δ: 0.3 ppm)

8.2.7.1.7 Synthese des Thioxothiazolidinon-C06-Analogons

2-Thioxo-3-p-tolylthiazolidin-4-on (441)Methode 1:^[396]

Eine Lösung aus 103 mg 4-Aminotoluol (**439**) (0.96 mmol, 1.0 eq (freigesetzt aus dem Hydrochlorid **439*HCl** mit stark basischem Ionentauscher)), 240 mg 2,2'-Thiocarbonylbis-(sulfanediyl)diessigsäure (**440**) (1.06 mmol, 1.1 eq) in 2 mL Wasser wird für 15 min auf 160 °C in der Mikrowelle erhitzt.

Die klare Lösung mit gelbem Feststoff wird mit ca. 10 mL Wasser versetzt und dreimal mit je ca. 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (4:1) aufgereinigt und aus MeOH umkristallisiert.

Methode 2:^[397]

Eine Lösung aus 478 mg 4-Aminotoluol (**439**) (4.46 mmol, 1.0 eq (freigesetzt aus dem Hydrochlorid **439*HCl** mit stark basischem Ionentauscher)), 1.05 g 2,2'-Thiocarbonylbis-(sulfanediyl)diessigsäure (**440**) (4.46 mmol, 1.0 eq) in 35 mL Wasser wird für zwei Stunden auf zum Sieden erhitzt.

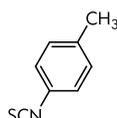
Die feststoffhaltige Mischung wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Der gelbliche Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und aus MeOH umkristallisiert.

Methode 3:^[399]

Zu einer Lösung aus 755 mg 1-Isothiocyanato-4-methylbenzol (**442**) (5.06 mmol, 1.0 eq) und 537 mg Thioglycolsäuremethylester (**338**) (5.06 mmol, 1.0 eq) in 15 mL Dichlormethan werden bei 0 °C 0.21 mL Triethylamin (1.52 mmol, 0.3 eq) tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird dann 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel der gelben Lösung wird im Vakuum entfernt und der gelbe Rückstand aus MeOH umkristallisiert.

<i>Ausbeute:</i>	<u>Methode 1:</u> 17 mg (8%) <u>Methode 2:</u> 144 mg (15%) <u>Methode 3:</u> 928 mg (82%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₀ H ₉ NOS ₂
<i>Molmasse:</i>	223.32 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelblicher Feststoff
<i>R_f-Wert:</i>	0.50 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆):</i>	δ = 7.32 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.12 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 4.37 (s, 2H, -CH ₂ -), 2.36 (s, 3H, -CH ₃).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 221.6 [M-H] ⁻ , 439.2 [M-H] ²⁻

1-Isothiocyanato-4-methylbenzol (442)^[398]

Eine Suspension aus 1.50 g 4-Aminotoluol Hydrochlorid (**439*HCl**) (10.44 mmol, 1.0 eq), 4.33 g Kaliumcarbonat (31.33 mmol, 3.0 eq) in 15 mL Wasser wird ca. 15 min bei Raumtemperatur gerührt, dann werden 0.8 mL Kohlenstoffdisulfid (12.53 mmol, 1.2 eq) tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

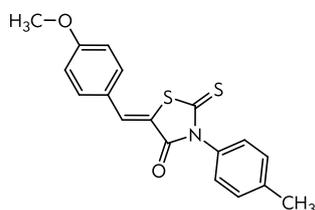
Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt dann wird eine Lösung aus 963 mg Cyanurchlorid (5.22 mmol, 0.5 eq) in 15 mL Dichlormethan tropfenweise zugegeben. Die Suspension wird für drei Stunden bei 0 °C gerührt.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Die Lösung wird mit ca. 25 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird noch zweimal mit je ca. 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das ölige Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether aufgereinigt.

Ausbeute:	1.54 g (quant.)
Summenformel:	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NS}$
Molmasse:	149.21 g/mol
Aussehen:	farbloses Öl
R_f -Wert:	0.43 (Petrolether)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 7.13$ (s, 4H, 2H,3H,5H,6H-Tolyl), 2.35 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).
ESI-MS:	$m/z = 151.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

(E)-5-(4-Methoxybenzyliden)-2-thioxo-3-p-tolylthiazolidin-4-on
(ST-1754 (443))^[399]



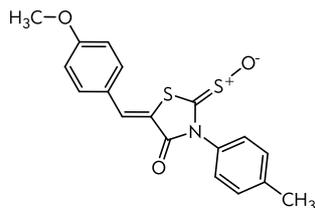
Eine Suspension aus 100 mg 2-Thioxo-3-p-tolylthiazolidin-4-on (**441**) (0.45 mmol, 1.0 eq), 61 mg 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (0.45 mmol, 1.0 eq), 104 mg Ammoniumacetat (1.34 mmol, 3.0 eq) in 5 mL Eisessig wird für 15 min auf 130 °C in der Mikrowelle erhitzt.

Die gelbe Suspension wird auf ca. 15 mL Wasser gegeben und ca. 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Der gelbe Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute:	120 mg (79%)
Summenformel:	$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}_2$
Molmasse:	341.45 g/mol
Aussehen:	sonnengelber Feststoff
Bezeichnung:	AL889, ST-1754
R_f -Wert:	0.69 (Hex/EE 1:1)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta = 7.76$ (s, 1H, $-\text{CH}=\text{C}$), 7.51 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.36 (d, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.16 (d, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.02 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.89 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.44 (s, 6H, $-\text{CH}_3$).
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3):	$\delta = 193.7, 167.8, 161.8, 139.8, 133.5, 132.8, 132.4, 130.3, 128.1, 126.1, 120.3, 115.0, 55.6, 21.4$.
Schmelzpunkt:	209 °C
ESI-MS:	$m/z = 341.26$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 364.15 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
CHN:	Ber.: C 63.32, H 4.43, N 4.10, S 18.78 Gef.: C 63.26, H 4.43, N 4.17, S 18.63

8.2.7.1 Synthese der Derivate mit variiertem Kern

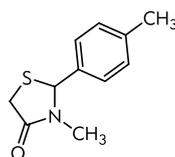
(E)-5-(4-methoxybenzyliden)-2-sulfinyl-3-p-tolylthiazolidin-4-on (ST-1753 (444))



Eine Suspension aus 97 mg 2-Thioxo-3-p-tolylthiazolidin-4-on (**441**) (0.43 mmol, 1.0 eq), 5 μ L 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (0.43 mmol, 1.0 eq), einem Tropfen Piperidin in 1 mL EtOH wird für 15 min auf 100 °C in der Mikrowelle erhitzt.

Die feste gelbe Mischung wird aus EtOH umkristallisiert.

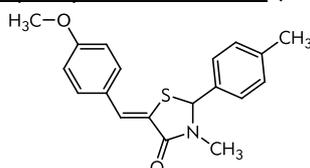
<i>Ausbeute:</i>	82 mg (53%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃ S ₂
<i>Molmasse:</i>	357.45 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelber Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL881, ST-1753
<i>R_f-Wert:</i>	0.65 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 7.75 (s, 1H, -CH=), 7.51 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.36 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.17 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.02 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.89 (s, 3H, -OCH ₃), 2.44 (s, 6H, -CH ₃).
<i>¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 193.6, 167.8, 161.8, 139.8, 133.4, 132.8, 132.4, 130.3, 128.0, 126.1, 115.0, 111.4, 55.6, 21.4.
<i>Schmelzpunkt:</i>	212.8 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 358.15 [M+H] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 60.48, H 4.23, N 3.92 S 17.94 Gef.: C 60.30, H 4.19, N 3.88, S 18.12

8.2.7.1.8 Synthese des N-Methyl-C06-Analogons**3-Methyl-2-p-tolylthiazolidin-4-on (449)**

Eine Mischung aus 1.0 mL 4-Methylbenzaldehyd (**448**) (8.44 mmol, 1.0 eq) und 0.75 mL 40%iger Methylamin-Lösung in Wasser (**447**) (8.44 mmol, 1.0 eq) in 25 mL THF wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 897 mg Thioglykolsäuremethylester (**338**) (8.44 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Lösung wird für 17 Stunden bei Raumtemperatur und für 5 Stunden bei 50 °C gerührt.

Das Lösemittel der klaren Lösung wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (9:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	1.50 g (85%)
Summenformel:	C ₁₁ H ₁₃ NOS
Molmasse:	207.29 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _F -Wert:	0.24 (Hex/EE 1:2)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.38 (s, 1H, -CH=), 7.24 (s, 4H, 2H,3H,5H,6H-Toyl), 7.02 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 6.04 (s, 1H, -CH-), 3.78 (s, 3H, -OCH ₃), 2.76 (s, 3H, -NCH ₃), 2.31 (s, 3H, -CH ₃).
ESI-MS:	m/z = 208.8 [M+H] ⁺ , 230.7 [M+Na] ⁺

(Z)-5-(4-Methoxybenzyliden)-3-methyl-2-p-tolylthiazolidin-4-on (ST-1749 (450))

Eine Mischung aus 171 mg 3-methyl-2-p-tolylthiazolidin-4-on (**449**) (0.82 mmol, 1.0 eq), 0.1 mL 4-Methoxybenzaldehyd (**336**) (0.82 mmol, 1.0 eq) und 80 mg NaOH (2 mmol, 2.4 eq) in 2.5 mL abs. EtOH wird für 20 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Das Lösemittel der braun-roten Lösung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 25 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (3:1) aufgereinigt und aus Et₂O umkristallisiert.

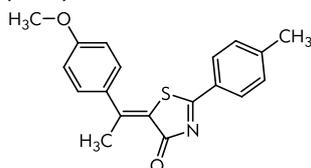
Ausbeute:	100 mg (37%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₉ NO ₂ S*0.1 H ₂ O
Molmasse:	325.42 g/mol
Aussehen:	hellgelber Feststoff
Bezeichnung:	AL824, ST-1749
R _F -Wert:	0.41 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.38 (s, 1H, -CH=), 7.24 (s, 4H, 2H,3H,5H,6H-Toyl), 7.02 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 6.04 (s, 1H, -CH-), 3.78 (s, 3H, -OCH ₃), 2.76 (s, 3H, -NCH ₃), 2.31 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 165.5, 159.2, 138.7, 135.3, 130.7, 130.7, 129.7, 127.4, 126.7, 123.3, 114.4, 62.7, 55.3, 20.0, 20.8.

8.2.7.1 Synthese der Derivate mit variiertem Kern

<i>Schmelzpunkt:</i>	169 °C
<i>ESI-MS:</i>	$m/z = 326.3 [M+H]^+$, $348.2 [M+Na]^+$
<i>CHN:</i>	Ber.: C 70.12, H 5.88, N 4.30, S 9.85 Gef.: C 69.67, H 5.71, N 4.00, S 10.08
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: $m/z = 326.12093 [M+H]^+$ Gefunden: $m/z = 326.12078 [M+H]^+$ (Δ : 0.5 ppm)

8.2.7.2 Synthese der Derivate mit variiertes Arylideneinheit

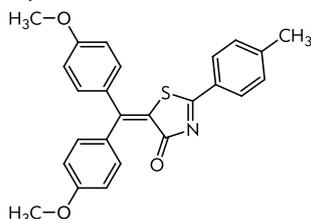
8.2.7.2.1 Synthese der substituierten und des verlängerten Yliden-C06-Analogon

(Z)-5-(1-(4-Methoxyphenyl)ethyliden)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1635 (452))^{nach[403]}

Eine Suspension aus 75 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.39 mmol, 1.0 eq), 177 mg 4-Methoxyacetophenon (**451**) (1.18 mmol, 3.0 eq) und 91 mg Ammoniumacetat (1.18 mmol, 3.0 eq) in 3 mL abs. Toluol wird für 45 min in der Mikrowelle auf 130 °C erhitzt.

Das Lösemittel der schwärzlich, Suspension wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (5:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	71 mg (56%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₇ NO ₂ S·0.25 H ₂ O
Molmasse:	323.41 g/mol
Aussehen:	ockerfarbender Feststoff
Bezeichnung:	AL554, ST-1635
R _f -Wert:	0.48 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.96 (d, ³ J = 8.3 Hz, 2H, 3,5H-Tolyl), 7.58 (d, ³ J = 9.0 Hz, 2H, 3,5H-PhOMe), 7.42 (d, ³ J = 8.0 Hz, 2H, 2,6H-Tolyl), 7.09 (d, ³ J = 8.8 Hz, 2H, 2,6H-PhOMe), 3.83 (s, 3H, -OCH ₃), 2.78 (s, 3H, -CH ₃), 2.41 (s, 3H, Tolyl-CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 184.9, 180.1, 160.4, 155.4, 145.9, 135.7, 130.0, 129.0, 128.8, 127.9, 126.1, 114.3, 55.4, 21.4, 21.01.
Schmelzpunkt:	161 °C
ESI-MS:	m/z = 324.5 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 69.59, H 5.38, N 4.37, S 9.78 Gef.: C 69.70, H 5.41, N 4.13, S 9.55
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 324.10528 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 324.10556 [M+H] ⁺ (Δ: 0.9 ppm)

5-(bis(4-Methoxyphenyl)methylen)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1757 (454))^{nach[403]}

Eine Suspension aus 105 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.55 mmol, 1.0 eq), 274 mg bis(4-Methoxyphenyl)methanon (**453**) (1.10 mmol, 2.0 eq) und 127 mg Ammoniumacetat (1.65 mmol, 3.0 eq) in 3 mL abs. Toluol wird für 45 min in der Mikrowelle auf 130 °C erhitzt.

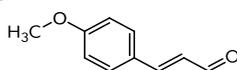
Das Lösemittel der schwärzlich, Suspension wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 25 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (4:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	49 mg (22%)
Summenformel:	C ₂₅ H ₂₁ NO ₃ S

8.2.7.2 Synthese der Derivate mit variiertem Arylideneinheit

Molmasse:	415.50 g/mol
Aussehen:	orangener Feststoff
Bezeichnung:	AL901, ST-1757
R _F -Wert:	0.21 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.99 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Toyl), 7.35-7.27 (m, 6H, 2H,6H-Toyl + 2 x 2H,6H-PhOMe), 6.94-6.87 (m, 4H, 2 x 3H,5H-PhOMe), 3.86 (pd, 6H, 2x OCH ₃), 2.44 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 166.7, 165.5, 161.2, 155.5, 132.6, 131.9, 129.7, 128.2, 123.9, 118.6, 115.6, 113.9, 113.5, 55.5, 55.3, 21.9.
Schmelzpunkt:	208.6 °C
ESI-MS:	m/z = 416.7 [M+H] ⁺ , 438.6 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 72.27, H 5.09, N 3.37, S 7.72 Gef.: C 72.00, H 5.38, N 3.20, S 7.57

(E)-3-(4-Methoxyphenyl)acrylaldehyd (456) ^{nach[404]}

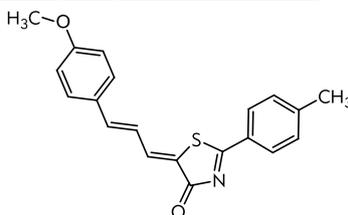


Eine Mischung aus 200 mg 4-Iodoanisol (0.85 mmol, 1.0 eq) in 4 ml abs. DMF wird 5 min mit Argon entgast. Dann werden 0.4 mL Acroleindiacetal (2.56 mmol, 3.0 eq), 177 mg Kaliumcarbonat (1.28 mmol, 1.5 eq) und 10 mg Palladiumdiacetat (0.04 mmol, 0.05) zugeben und die Mischung wird zweimal für je 10 min in der Mikrowelle auf 90 °C erhitzt.

Die Reaktionsmischung wird auf ca. 20 mL 2M HCl gegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die wässrige Phase dreimal mit je ca. 25 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (5:1) aufgereinigt.

Ausbeute:	91 mg (66%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₀ O ₂
Molmasse:	162.19 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.60 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.66 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, -CHO), 7.53 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.43 (d, 1H, ³ J = 15.9 Hz, CH=CH-PhOMe), 6.95 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 6.61 (dd, 1H, ³ J = 15.8 Hz, ³ J = 7.8 Hz, CH=CH-PhOMe), 3.86 (s, 3H, -OCH ₃).

(Z)-5-((E)-3-(4-Methoxyphenyl)allylidene)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1756 (457))



Eine Suspension aus 55 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.29 mmol, 1.0 eq), 47 mg (E)-3-(4-Methoxyphenyl)acrylaldehyd (**456**) (0.29 mmol, 1.0 eq) und 1 Tropfen Piperidin in 1.5 mL abs. MeOH wird für 10 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

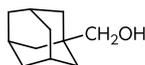
Die dunkelrote Suspension wird mit MeOH verdünnt und abgesaugt.

Ausbeute:	23 mg (24%)
Summenformel:	C ₂₀ H ₁₇ NO ₂ S·0.75 H ₂ O

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

<i>Molmasse:</i>	335.42 g/mol
<i>Aussehen:</i>	dunkelorangener Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL897, ST-1756
<i>R_f-Wert:</i>	0.29 (Hex/EE 2:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 8.05 (d, 2H, 3J = 8.2 Hz, 3H,5H-Toyl), 7.71 (d, 1H, 3J = 11.4 Hz, Ph-CH=CH-CH=), 7.50 (d, 2H, 3J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.34 (d, 2H, 3J = 8.0 Hz, 2H,6H-Toyl), 7.09 (d, 1H, 3J = 15.2 Hz, Ph-CH=CH-CH=), 6.92 (d, 2H, 3J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 6.82 (dd, 1H, 3J = 15.2 Hz, 3J = 11.5 Hz, Ph-CH=CH-CH=), 3.86 (s, 3H, -OCH ₃), 2.47 (s, 3H, -CH ₃).
<i>¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 184.9, 182.7, 161.4, 146.2, 144.8, 138.0, 138.0, 129.9, 129.6, 128.8, 128.5, 128.1, 123.3, 114.6, 55.5, 22.0.
<i>Schmelzpunkt:</i>	190.7 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 358.21 [M+Na] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 68.84, H 5.34, N 4.01, S 9.19 Gef.: C 68.71, H 5.00, N 3.89, S 8.99
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: m/z = 336.10528 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 336.10538 [M+H] ⁺ (Δ : 0.3 ppm)

8.2.7.2.2 Synthese der Derivate mit Nicht-aromatischem Yliden-Substituenten

Hydroxymethyladamantan (459)^{nach[405]}

Zu einer 0 °C kalten Mischung aus 1.35 g LiAlH₄ (35.6 mmol, 1.28 eq) in 45 ml abs. THF wird eine Lösung aus 5.00 g Adamantylcarbonsäure (**458**) (27.7 mmol, 1.0 eq) in 45 mL abs. THF tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird dann zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Es werden langsam 1.35 mL Wasser, 2.7 mL 10%ige NaOH und 3.05 mL Wasser zugesetzt. Die Suspension wird 60 Minuten gerührt und über gepresstes Celite abfiltriert (LiAlH₄ 1-2-3 work up)^[456]. Das Lösungsmittel des Filtrats wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 150 mL Et₂O aufgenommen, mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

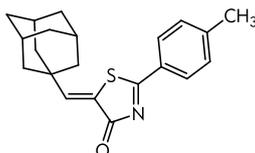
Ausbeute:	2.92 g (64%)
Summenformel:	C ₁₁ H ₁₈ O
Molmasse:	166.26 g/mol
Aussehen:	weißer Feststoff
R _F -Wert:	0.41 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 3.20 (s, 2H, -CH ₂ -OH), 1.99 (s, 3H, 3x Adamantyl-CH-), 1.76-1.62 (m, 6H, 3x Adamantyl-CH ₂ -), 1.51-1.50 (m, 6H, 3x Adamantyl-CH ₂ -), 1.30 (br s, 1H, -CH ₂ -OH).
ESI-MS:	m/z = 164.7 [M-H] ⁻

Adamantylcarbaldehyd (460 E41)^[406]

Zu einer -60 °C kalten Mischung aus 0.86 mL Oxalylchlorid (12.99 mmol, 1.2 eq) in 20 mL abs. Dichlormethan werden 2 mL abs. DMSO zugetropft und die Mischung dann mit 5 mL Dichlormethan verdünnt. Nach 30 min rühren bei -60 °C wird eine Lösung aus 1.80 g Hydroxymethyladamantan (**459**) (10.83 mmol, 1.0 eq) in 20 ml abs. Dichlormethan zugegeben und die Mischung für eine Stunde bei -60 °C gerührt. Dann werden 7.5 mL Triethylamin (54.1 mmol, 5.0 eq) zugegeben und die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur gebracht, mit ca. 20 mL Wasser verdünnt und weitere 15 min gerührt.

Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige noch zweimal mit je ca. 75 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je ca. 150 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

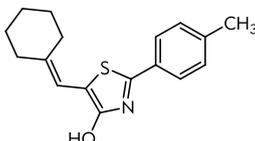
Ausbeute:	1.40 g (79%)
Summenformel:	C ₁₁ H ₁₆ O
Molmasse:	164.24 g/mol
Aussehen:	weißlicher Feststoff
R _F -Wert:	0.66 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.31 (s, 1H, -CHO), 2.07 (s, 3H, 3x Adamantyl-CH-), 1.75-1.71 (m, 12H, 6x Adamantyl-CH ₂ -).
ESI-MS:	m/z = 242.4 [M+DMSO] ⁺

(Z)-5-(Adamantylmethylene)-2-p-tolylthiazol-4(5H)-on (ST-1758 (461))

Eine Suspension aus 80 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.42 mmol, 1.0 eq), 70 mg Adamantyl-carbaldehyd (**460**) (0.42 mmol, 1.0 eq) und 1 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 10 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

Das Lösungsmittel der dunkelroten Mischung wird im Vakuum entfernt und der Rückstand aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute:	48 mg (34%)
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₃ NOS
Molmasse:	337.48 g/mol
Aussehen:	hellgelber Feststoff
Bezeichnung:	AL916, ST-1758
R _F -Wert:	0.69 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 8.06 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.33 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.15 (s, 1H, -CH-), 2.5 (s, 3H, -CH ₃), 2.08 (s, 3H, 3x Adamantyl-CH-), 1.88-1.61 (m, 12H, 6x Adamantyl-CH ₂ -).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 187.9, 183.6, 152.7, 146.2, 129.9, 129.4, 128.8, 125.0, 41.0, 37.0, 36.4, 28.1, 21.9.
Schmelzpunkt:	197.4 °C
ESI-MS:	m/z = 338.50 [M+H] ⁺ , 360.50 [M+Na] ⁺
CHN:	Ber.: C 74.74, H 6.87, N 4.15, S 9.50 Gef.: C 74.88, H 6.92, N 3.90, S 9.69

5-(Cyclohexylidenemethyl)-2-p-tolylthiazol-4-ol (ST-1688 (464))

Eine Mischung aus 155 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.81 mmol, 1.0 eq), 93 mg Cyclohexancarbaldehyd (**462**) (0.81 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 10 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

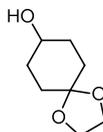
Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute:	28 mg (12%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₉ NOS*0.25 H ₂ O
Molmasse:	285.40 g/mol
Aussehen:	gelber Feststoff
Bezeichnung:	AL629, ST-1688
R _F -Wert:	0.51 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 10.81 (s, 1H, -OH), 7.73 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.27 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-Tolyl), 6.18 (s, 1H, -CH-), 2.42 (s, 2H, =CCH ₂), 2.34 (s, 3H, -CH ₃), 2.23 (s, 2H, =CCH ₂), 1.56 (s, 6H, 3x CH ₂ Cyclo-hexyl).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 159.8, 159.0, 139.5, 139.2, 130.4, 129.6, 124.9, 110.6, 104.5, 37.0, 29.9, 28.1, 27.0, 25.8, 20.8.
Schmelzpunkt:	120 °C
ESI-MS:	m/z = 286.13 [M+H] ⁺

8.2.7.2 Synthese der Derivate mit variiertem Arylideneinheit

CHN:	Ber.: C 70.43, H 6.78, N 4.83, S 11.06 Gef.: C 70.78, H 6.60, N 4.58, S 10.77
MALDI-HRMS:	Berechnet: $m/z = 286.12601 [M+H]^+$ Gefunden: $m/z = 286.12600 [M+H]^+$ (Δ : 0.1 ppm)

1,4-Dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (466)^[407]

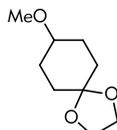


Zu einer 0 °C kalten Mischung aus 5.00 g 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-on (**465**) (32.0 mmol, 1.0 eq) in 75 ml abs. MeOH werden 1.28 g NaBH₄ (33.9 mmol, 1.06 eq) gegeben und die Mischung 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung wird mit 1 M HCL neutralisiert und dreimal mit je ca. 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	4.25 g (84%)
Summenformel:	C ₈ H ₁₄ O ₃
Molmasse:	158.20 g/mol
Aussehen:	farbloses Öl
R _F -Wert:	0.08 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	$\delta = 3.97$ (s, 4H, -O-(CH ₂) ₂ -O-), 3.84-3.75 (m, 1H, -CH-OMe), 1.91-1.51 (m, 8H, -(CH ₂) ₂ -Acetal + -(CH ₂) ₂ -CHOMe), 1.46 (br s, 1H, -OH).

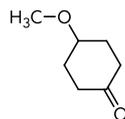
8-Methoxy-1,4-dioxaspiro[4.5]decan (467)^[407,408]



Zu einer 0 °C kalten Mischung aus 2.15 g 60%igem Natriumhydrid (53.73 mmol, 2.0 eq) in 50 ml abs. THF wird eine Lösung aus 4.25 g 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (**466**) (26.9 mmol, 1.0 eq) in 50 mL abs. THF zugegeben. Die Lösung wird auf Raumtemperatur gebracht, 10 mL Methyljodid (160.6 mmol, 6.0 eq) werden zugegeben und die Mischung 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionsmischung werden ca. 75 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung zu gesetzt und sie wird dreimal mit je ca. 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (2:1) aufgereinigt.

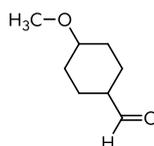
Ausbeute:	4.6 g (quant.)
Summenformel:	C ₉ H ₁₆ O ₂
Molmasse:	172.22 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _F -Wert:	0.34 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	$\delta = 3.93$ (s, 4H, -O-(CH ₂) ₂ -O-), 3.38-3.25 (m, 4H, -CH-OMe + -OCH ₃), 1.86-1.49 (m, 8H, -(CH ₂) ₂ -Acetal + -(CH ₂) ₂ -CHOMe).
ESI-MS:	$m/z = 170.7 [M-H]^-$

4-Methoxycyclohexanon (468)^[407,408]

Eine Lösung aus 4.69 g 8-Methoxy-1,4-dioxaspiro[4.5]decan (**467**) (27.2 mmol, 1.0 eq) in 100 mL abs. THF und 100 mL 1M HCl wird für 30 min zum Sieden erhitzt.

Das THF wird im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wird zu ca. 300 mL ges. NaHCO₃-Lösung gegeben und dreimal mit je ca. 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	3.21 g (92%)
Summenformel:	C ₇ H ₁₂ O ₂
Molmasse:	128.17 g/mol
Aussehen:	farbloses Öl
R _F -Wert:	0.26 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 3.61 (br s, 1H, -CH-OMe), 3.93 (s, 3H, -OCH ₃), 2.61-2.49 (m, 2H, -(CH _{ax}) ₂ -C=O), 2.29-1.87 (m, 6H, -(CH ₂) ₂ -CHOMe + -(CH _{eq}) ₂ -C=O).
ESI-MS:	m/z = 129.3 [M+H] ⁺

4-Methoxycyclohexancarbaldehyd (470)^[409]

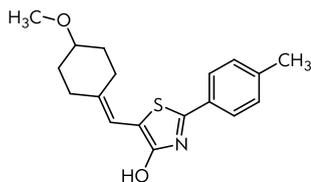
Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 3.03 g (Methoxymethyl)triphenylphosphoniumchlorid (8.84 mmol, 1.3 eq) in 25 mL abs. THF werden topfenweise 5.1 mL 2M LDA in Hexan, THF, Ethylbenzol (10.18 mmol, 1.5 eq) zugegeben und die Mischung 30 min bei 0 °C gerührt. Dann wird die rote Lösung auf -78 °C gekühlt und eine Lösung aus 0.870 g 4-Methoxycyclohexanon (**469**) (6.79 mmol, 1.0 eq) in 500 mL abs. THF wird zu getropft. Die Mischung wird eine Stunde bei -78 °C und weitere 18 Stunden ohne die Kühlung zu erneuern gerührt bevor sie mit 2 M HCl auf pH 2 (ca. 20 mL) gebracht wird und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wird.

Es werden ca. 50 mL Wasser zugesetzt und dreimal mit je ca. 150 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat (4:1) aufgereinigt, wobei 117 mg (14%) Edukt zurückisoliert werden.

Ausbeute:	203 mg (21%)
Summenformel:	C ₈ H ₁₄ O
Molmasse:	142.20 g/mol
Aussehen:	klares Öl
R _F -Wert:	0.32 (Hex/EE 4:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 9.64 (s, 1H, -OH), 3.35 (s, 3H, -OCH ₃), 3.16-3.07 (m, 1H, -CH-CHO), 2.26-2.17 (m, 1H, -CH-OMe), 2.11-2.01 (m, 4H, -(CH _{ax}) ₂ -CHCHO + -(CH _{ax}) ₂ -C=O), 1.42-1.25 (m, 4H, -(CH _{eq}) ₂ -CHCHO + -(CH _{eq}) ₂ -C=O).
ESI-MS:	m/z = 143.22 [M+H] ⁺ , 165.17 [M+Na] ⁺

8.2.7.2 Synthese der Derivate mit variiertem Arylideneinheit

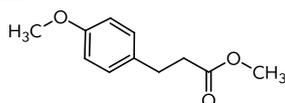
5-((4-Methoxycyclohexylidene)methyl)-2-p-tolylthiazol-4-ol (ST-1827 (372))



Eine Mischung aus 105 mg 2-p-Tolylthiazol-4(5H)-on (**339**) (0.55 mmol, 1.0 eq), 78 mg 4-Methoxycyclohexancarbaldehyd (**470**) (0.55 mmol, 1.0 eq) und 2 Tropfen Piperidin in 2 mL abs. MeOH wird für 5 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt.

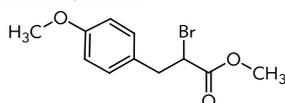
Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand aus EtOH umkristallisiert.

<i>Ausbeute:</i>	34 mg (20%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₂₁ NO ₂ S*0.25 H ₂ O
<i>Molmasse:</i>	315.43 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelber Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL929, ST-1827
<i>R_f-Wert:</i>	0.53 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, DMSO-<i>d</i>₆):</i>	δ = 10.86 (s, 1H, -OH), 7.73 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,6H-Tolyl), 7.27 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 3H,5H-Tolyl), 6.22 (s, 1H, -CH-), 3.26 (s, 3H, -OCH ₃), 2.69-2.59 (m, 1H, -CH-OMe), 2.44-2.10 (m, 7H, -CH ₃ + -(CH ₂) ₂ -C=C), 1.90-1.84 (m, 2H, -(CH _{ax}) ₂ -CH-OMe), 1.52-1.38 (m, 2H, -(CH _{ax}) ₂ -CH-OMe).
<i>¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 159.9, 159.2, 139.6, 137.6, 130.4, 129.6, 124.9, 111.2, 104.4, 76.3, 55.0, 33.1, 32.0, 31.0, 25.9, 20.8.
<i>Schmelzpunkt:</i>	136.5 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 316.22 [M+H] ⁺ , 338.22 [M+Na] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 67.57, H 6.77, N 4.38, S 10.02 Gef.: C 67.73, H 6.38, N 4.19, S 10.20
<i>MALDI-HRMS:</i>	Berechnet: m/z = 316.13658 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 316.13610 [M+H] ⁺ (Δ: 1.5 ppm)

8.2.7.2.3 Synthese des „Yliden-reduzierten“ C06**(4-Methoxyphenyl)propansäuremethylester (475)**^{nach [413,457]}

Eine Mischung aus 1.0 g 4-Methoxyphenylpropansäure (**474**) (5.55 mmol, 1.0 eq) und 0.35 mL konz. Schwefelsäure (6.66 mmol, 1.2 eq) in 5 mL MeOH wird für 15 min auf 100 °C in der Mikrowelle erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird in ca. 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je ca. 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

<i>Ausbeute:</i>	1.03 mg (95%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
<i>Molmasse:</i>	194.23 g/mol
<i>Aussehen:</i>	gelbes Öl
<i>R_F-Wert:</i>	0.60 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 7.11 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.83 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.78 (s, 3H, C(O)CH ₃), 3.65 (s, 3H, -COOCH ₃), 2.90 (t, 1H, ³ J ₁ = 8.0 Hz, ³ J ₂ = 7.5 Hz, -CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 2.60 (t, 1H, ³ J ₁ = 8.0 Hz, ³ J ₂ = 7.4 Hz, -CH ₂ -CH ₂ -COOMe).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 217.18 [M-H] ⁻

2-Brom-3-(4-methoxyphenyl)propansäuremethylester (476)^{nach [415]}

Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 10 g 4-Methoxyanilin (**477**) (81.2 mmol, 1.0 eq) in einer Mischung aus 200 mL Aceton, 75 mL MeOH und 28 mL 48%iger wässriger HBr (244 mmol, 3.0 eq) wird eine Lösung aus 6.16 g Natriumnitrit (89.32 mmol, 1.10 eq) in 10 mL Wasser tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird für 30 min bei 0 °C gerührt.

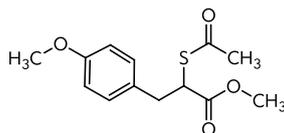
Dann werden 44.2 mL Methylacrylat (**479**) (487 mmol, 6.0 eq) zugegeben. Das Eisbad entfernt und 697 mg Kupfer(I)oxid (4.87 mmol, 0.06 eq) zugegeben und die Mischung für 1.5 Stunden heftig bei 35 °C gerührt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in ca. 200 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je ca. 150 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je ca. 250 mL Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das ölige Rohprodukt wird im Vakuum fraktioniert destilliert (Siedebereich 130 °C-170 °C bei 7 mbar). Literatur^[458] Siedepunkt: 102 °C bei 0.03 Torr

<i>Ausbeute:</i>	11.51 g (52%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₁ H ₁₃ BrO ₃
<i>Molmasse:</i>	273.12 g/mol
<i>Aussehen:</i>	rotes Öl
<i>R_F-Wert:</i>	0.86 (Hex/EE 1:1)
<i>¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):</i>	δ = 7.12 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.84 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 4.35 (dd, 1H, ³ J ₁ = 6.9 Hz, ³ J ₂ = 6.9 Hz, -CH ₂ -CHBr-), 3.79 (s, 3H, -PhOCH ₃), 3.72 (s, 3H, -OCH ₃), 3.40 (dd, 1H, ³ J ₁ = 8.6 Hz, ³ J ₂ = 8.6 Hz, -CHH _{trans} -CHBr-), 3.18 (dd, 1H, ³ J ₁ = 6.9 Hz, ³ J ₂ = 6.9 Hz, -CHH _{cis} -CHBr-).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 273.18, 275.08 [M+H] ⁺ , 295.06, 297.06 [M+Na] ⁺

8.2.7.2 Synthese der Derivate mit variiertem Arylideneinheit

2-(Acetylthio)-3-(4-methoxyphenyl)propansäuremethylester (480)^{nach [416,417]}

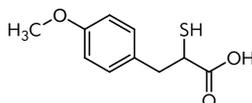


Zu einer 0 °C kalten Suspension aus 469 mg 60%ig Natriumhydrid auf Mineralöl (11.73 mmol, 1.1 eq) in 30 mL abs. DMF werden 0.79 mL Thioessigsäure (11.66 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Mischung wird 20 Minuten bei 0 °C gerührt. Dann wird eine Lösung aus 2.91 g 2-Brom-3-(4-methoxyphenyl)propansäuremethylester (**476**) (10.66 mmol, 1.0 eq) in 15 mL abs. DMF tropfenweise dazu gegeben und die Mischung wird 1 Stunde bei 0 °C gerührt.

Die gelbe Reaktionslösung wird auf 15 mL ges. NaCl-Lösung gegeben und fünfmal mit je ca. 25 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	2.81 g (98%)
Summenformel:	C ₁₃ H ₁₆ O ₄ S
Molmasse:	268.33 g/mol
Aussehen:	gelbes Öl
R _F -Wert:	0.63 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.12 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.82 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-PhOMe), 4.40 (t, 1H, ³ J ₁ = 7.6 Hz, -CH ₂ -CHSAC-), 3.78 (s, 3H, -PhOCH ₃), 3.67 (s, 3H, -OCH ₃), 3.18 (dd, 1H, ³ J ₁ = 8.1 Hz, ³ J ₂ = 8.2 Hz, -CHH _{trans} -CHSAC-), 3.00-2.88 (m, 1H, -CHH _{cis} -CHSAC-) 2.32 (s, 3H, -SCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 269.17 [M+H] ⁺ , 291.17 [M+Na] ⁺

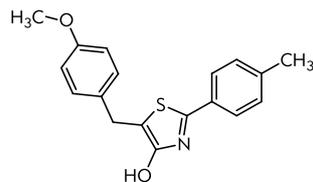
2-(Mercapto)-3-(4-methoxyphenyl)propansäure (481)^{nach [416,417]}



Zu einer Lösung aus 2.34 g Kaliumhydroxyd (41.7 mmol, 4 eq) in 15 mL abs. MeOH wird eine Lösung aus 2.8 g 2-(Acetylthio)-3-(4-methoxyphenyl)propansäuremethylester (**480**) (10.4 mmol, 1.0 eq) in 20 mL abs. MeOH gegeben und die Mischung, unter Argon, für 10 Stunden auf 80 °C erhitzt.

Das Lösungsmittel der orangen Lösung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 16 mL konz. HCl gelöst, wobei ein Feststoff entsteht. Der Mischung werden ca. 25 mL Wasser zugesetzt und sie wird dreimal mit je ca. 75 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je einmal mit ca. 150 mL Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	2.20 g (quant.)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₀ O ₃ S
Molmasse:	212.27 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _F -Wert:	0.28 (DCM/MeOH 95:5 + 5%HOAc)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 12.52 (br s, 1H, -COOH), 7.15 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.83 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.72 (s, 3H, -PhOCH ₃), 3.59-3.49 (m, 1H, -CH ₂ -CHSH-), 3.04 (pq, 2H, ³ J ₁ = 7.4 Hz, ³ J ₂ = 8.7 Hz, -CH ₂ -CHSH-), 2.83 (dd, 2H, ³ J ₁ = 6.6 Hz, ³ J ₂ = 7.1 Hz, -SH).
ESI-MS:	m/z = 211.09 [M-H] ⁻

5-(4-Methoxybenzyl)-2-p-tolylthiazol-4-ol (ST-1741 (472))Method 1.^{nach [412,418]}

Eine Mischung aus 306 mg *p*-Tolynitril (**337**) (2.62 mmol, 1.0 eq), 555 mg 2-(Merapto)-3-(4-methoxyphenyl)propansäure (**382**) (1.0 eq), 1 mL Triethylamin (2.7 eq) und 0.5 mL MeOH wird zweimal für je 15 min bei 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus Aceton/Wasser und aus Ethanol umkristallisiert.

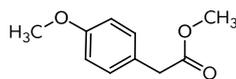
Method 2.^{nach [412,418]}

Eine Mischung aus 332 mg 4-Methylbenzothioamid (**340**) (2.20 mmol, 1.0 eq), 600 mg 2-Brom-3-(4-methoxyphenyl)propansäuremethylester (**476**) (2.20 mmol, 1.0 eq), 2 mL abs. Pyridin und 30 mL abs. Toluol wird für 19 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus wenig EtOH umkristallisiert.

<i>Ausbeute:</i>	<u>Method 1:</u> 50 mg (6%) <u>Method 2:</u> 233 mg (34%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₈ H ₁₇ NO ₂ S
<i>Molmasse:</i>	311.40 g/mol
<i>Aussehen:</i>	hellgelber, kristalliner Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL745, ST-1741
<i>R_f-Wert:</i>	0.57 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 10.47 (s, 1H, -OH), 7.66 (d, 2H, ³ J = 8.2 Hz, 3H,5H-Tolyl), 7.24 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2H,6H-PhOMe), 7.17 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 3H,5H-PhOMe), 6.86 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Tolyl), 3.89 (s, 2H, CH ₂), 3.17 (s, 3H, -OCH ₃), 2.32 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 159.4, 158.1, 157.7, 139.2, 132.5, 130.7, 129.5, 129.1, 124.7, 113.8, 107.5, 54.9, 28.8, 20.8.
<i>Schmelzpunkt:</i>	143 °C (Sublimation)
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 312.3 [M+H] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 69.43, H 5.50, N 4.50, S 10.30 Gef.: C 69.59, H 5.47, N 4.47, S 10.09

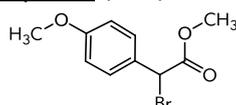
8.2.7.2.4 Synthese des C06-Derivats ohne Methyleninheit

(4-Methoxyphenyl)essigsäuremethylester (483)^{nach [413,457]}

Eine Mischung aus 5.02 g 4-Methoxyphenylessigsäure (**482**) (30.20 mmol, 1.0 eq) und 1.8 mL konz. Schwefelsäure (33.69 mmol, 1.2 eq) in 10 mL MeOH wird für 15 min auf 100 °C in der Mikrowelle erhitzt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird in ca. 100 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je ca. 75 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

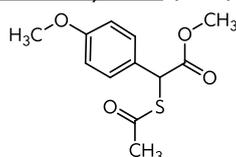
Ausbeute:	5.16 mg (95%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
Molmasse:	180.20 g/mol
Aussehen:	gelbes Öl
R _F -Wert:	0.61 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.20 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.86 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.80 (s, 3H, C(O)CH ₃), 3.69 (s, 3H, -COOCH ₃), 3.57 (s, 2H, -CH ₂ -).
ESI-MS:	m/z = 178.8 [M-H] ⁻

2-Brom-2-(4-methoxyphenyl)essigsäuremethylester (484)^[420]

Eine Mischung aus 485 mg 4-Methoxyphenylessigsäuremethylester (**483**) (2.69 mmol, 1.0 eq), 527 mg NBS (2.96 mmol, 1.1 eq), 22 mg AIBN (0.13 mmol, 0.5 eq) in 6 mL Tetrachlorkohlenstoff wird für 5 Stunden zum Sieden erhitzt.

Der Mischung wird mit ca. 30 mL Hexan verdünnt und über Celite[®] filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	670 mg (96%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₁ BrO ₃
Molmasse:	259.10 g/mol
Aussehen:	farbloses Öl
R _F -Wert:	0.65 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.88 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 5.35 (s, 1H, -CH-), 3.81 (s, 3H, C(O)CH ₃), 3.79 (s, 3H, -COOCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 296.7 [M+Cl] ⁻ , 373.6, 375.7, 377.6 [M+Cl+Br] ⁻

2-(Acetylthio)-2-(4-methoxyphenyl)essigsäuremethylester (485)^{nach [416,417]}

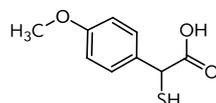
Zu einer Mischung aus 51 mg 60%iges Natriumhydrid auf Mineralöl (1.27 mmol, 1.1 eq) in 5 mL abs. DMF werden bei 0 °C 86 µL Thioessigsäure (1.16 mmol, 1.0 eq) zugegeben, wobei eine lebhafte Gasentwicklung zu beobachten ist. Die Mischung wird 20 min bei 0 °C gerührt. Dann wird eine Lösung aus 300 mg 2-Brom-2-(4-methoxyphenyl)essigsäuremethylester (**484**) (1.16 mmol, 1.0 eq) in 2.5 mL abs. DMF tropfenweise dazu gegeben und die Mischung wird 1 Stunde bei 0 °C gerührt.

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

Die gelbe Lösung wird auf 25 mL ges. NaCl-Lösung gegeben und dreimal mit je ca. 45 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je ca. 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	282 mg (96%)
Summenformel:	C ₁₂ H ₁₄ O ₄ S
Molmasse:	254.30 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _F -Wert:	0.62 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.30 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.86 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 5.2 7 (s, 1H, -CH-), 3.79 (s, 3H, C(O)CH ₃), 3.73 (s, 3H, -COOCH ₃), 3.34 (s, 3H, -PhOCH ₃).
ESI-MS:	m/z = 277.13 [M+Na] ⁺

2-Mercapto-2-(4-methoxyphenyl)essigsäure (486)^{nach [416,417]}

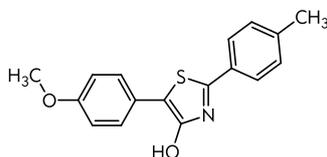


Zu einer Mischung aus 220 mg Kaliumhydroxid (3.9 mmol, 4 eq) in 5 mL abs. MeOH wird eine Lösung aus 250 mg 2-(Acetylthio)-2-(4-methoxyphenyl)essigsäuremethylester (**485**) (0.98 mmol, 1.0 eq) in 3 mL abs. MeOH gegeben und die Mischung, unter Argon, für 5.5 Stunden auf 80 °C erhitzt.

Das Lösungsmittel der orangenen Lösung wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ca. 5 mL konz. HCl gelöst. Der Suspension werden ca. 5 mL Wasser zugesetzt und sie wird dreimal mit je ca. 25 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je einmal mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	200 mg (quant.)
Summenformel:	C ₉ H ₁₀ O ₃ S
Molmasse:	198.24 g/mol
Aussehen:	gelbliches Öl
R _F -Wert:	0.11 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 12.84 (br s, 1H, -COOH), 7.35 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.89 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 4.74 (d, 1H, ³ J = 7.1 Hz, -CH-), 3.74 (s, 3H, OCH ₃), 3.43 (d, 1H, ³ J = 7.1 Hz, -SH).
ESI-MS:	m/z = 196.5 [M-H] ⁻

5-(4-Methoxyphenyl)-2-p-tolylthiazol-4-ol (ST-1700 (487))^{nach [412,418]}



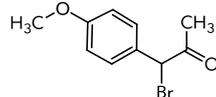
Eine Mischung aus 325 mg *p*-Tolylnitril (2.77 mmol, 1.0 eq), 550 mg 2-Mercapto-2-(4-methoxyphenyl)essigsäure (**486**) (2.77 mmol, 1.0 eq) und 1 mL Triethylamin (7.21 mmol, 2.6 eq) wird für 25 min in der Mikrowelle auf 100 °C erwärmt.

Die gelbliche Mischung wird aus MeOH umkristallisiert.

Ausbeute:	102 mg (12%)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₅ NO ₂ S
Molmasse:	297.37 g/mol
Aussehen:	gelber, kristalliner Feststoff

8.2.7.2 Synthese der Derivate mit variiertem Arylideneinheit

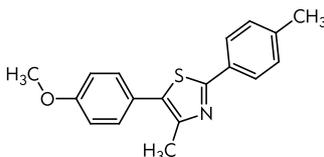
Bezeichnung:	AL710, ST-1700
R _F -Wert:	0.70 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 11.30 (br s, 1H, -OH), 7.75 (d, 2H, ³ J = 8.1 Hz, 2H,3H-Tolyl), 7.63 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-PhOMe), 7.30 (d, 2H, 2H,6H-Tolyl), 6.97 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-PhOMe), 3.77 (s, 3H, -OCH ₃), 2.35 (s, 3H, -CH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 158.6, 157.6, 157.2, 139.8, 130.5, 129.8, 127.3, 125.0, 124.3, 114.3, 107.1, 55.1, 20.9.
Schmelzpunkt:	226.7 °C
ESI-MS:	m/z = 298.163 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 68.66, H 5.08, N 4.71, S 10.78 Gef.: C 68.74, H 5.03, N 4.67, S 10.97

8.2.7.2.5 Synthese der Methylthiazolderivats1-Brom-1-(4-methoxyphenyl)propan-2-on (489)^[421]

Zu einer 0 °C kalten Lösung aus 1.54 mL 1-(4-Methoxyphenyl)propan-2-on (**488**) (9.73 mmol, 1.0 eq) in 10 mL Et₂O werden tropfenweise 0.5 mL Brom (9.73 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Mischung anschließend für 20 min bei Raumtemperatur gerührt.

Der gelben, klaren Reaktionsmischung werden ca. 40 mL Et₂O zugesetzt und diese nacheinander mit je ca. 50 mL Wasser, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute:	2.10 g (89%)
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₁ BrO ₂
Molmasse:	243.10 g/mol
Aussehen:	farbloses Öl
R _f -Wert:	0.46 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 7.36 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.90 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 5.43 (s, 1H, -CHBr-), 3.82 (s, 3H, -OCH ₃), 2.31 (s, 3H, -CH ₃).

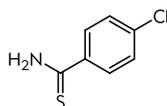
5-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-2-p-tolylthiazolium Hydrobromid (ST-1747 (490))

Eine Mischung aus 150 mg 4-Methylbenzothioamid (**340**) (0.99 mmol, 1.0 eq), 265 mg 1-Brom-1-(4-methoxyphenyl)propan-2-on (**489**) (1 eq) in 3.5 mL EtOH wird für 10 min auf 100 °C in der Mikrowelle erwärmt.

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Aceton umkristallisiert, in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Ausbeute:	219 mg (58%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₇ NOS·0.5 H ₂ O·HBr
Molmasse:	295.40 g/mol + 80.91 g/mol
Aussehen:	gelb-grünlicher Feststoff
Bezeichnung:	AL806, ST-1747
R _f -Wert:	0.55 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 8.30 (d, 2H, ³ J = 8.3 Hz, 2H,3H-Tolyl), 7.42-7.37 (m, 4H, 2H,3H,5H,6H-PhOMe), 7.04 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 2H,6H-Tolyl), 3.88 (s, 3H, -OCH ₃), 2.87 (s, 3H, -CH ₃), 2.44 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 168.3, 161.2, 145.7, 140.9, 132.9, 130.7, 130.5, 128.5, 123.0, 119.8, 115.1, 77.6, 77.1, 76.5, 55.6, 21.9, 13.6.
Schmelzpunkt:	213.8 °C
ESI-MS:	m/z = 296.4 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 56.11, H 4.97, N 3.64, S 8.32 Gef.: C 55.96, H 4.64, N 3.76, S 8.51
MALDI-HRMS:	Berechnet: m/z = 296.11036 [M+H] ⁺ Gefunden: m/z = 296.11059 [M+H] ⁺ (Δ: 0.8 ppm)

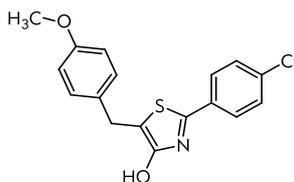
8.2.7.3 Synthese der optimierten Aryl-(Methylen)-Aryl-Hydroxythiazole

4-Chlorbenzothioamid (492)^[343]

Eine Lösung aus 3.55 g *p*-Chlorbenzonnitril (**491**) (25.83 mmol, 1.0 eq), 3 mL 40-48%ig Ammoniumsulfid Lösung in Wasser (25.83 mmol, 1 eq) und 15 mL MeOH wird für 25 min bei 80 °C in die Mikrowelle erwärmt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand aus MeOH umkristallisiert und mit kaltem MeOH nachgewaschen.

<i>Ausbeute:</i>	3.24 g (73%)
<i>Summenformel:</i>	C ₇ H ₆ ClNS
<i>Molmasse:</i>	171.65 g/mol
<i>Aussehen:</i>	kanariengelber, kristalliner Feststoff
<i>R_F-Wert:</i>	0.57 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ = 9.96 (br s, 1H, -NH ₂), 9.57 (br s, 1H, -NH ₂), 7.90 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 2H,6H-Ph), 7.48 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, 3H,5H-Ph).
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 172.5, 174.5 [M+H] ⁺

5-(4-Chlorbenzyl)-2-*p*-tolylthiazol-4-ol (ST-1829 (493))^{nach [412,418]}

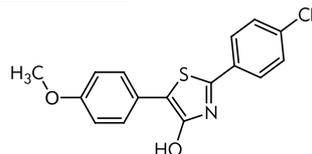
Eine Mischung aus 0.503 g 4-Chlorbenzothioamid (**492**) (2.93 mmol, 1.0 eq), 800 mg 2-Brom-3-(4-methoxyphenyl)propansäuremethylester (**476**) (2.93 mmol, 1.0 eq), 2 mL abs. Pyridin und 25 mL abs. Toluol wird für 17 Stunden zum Sieden erhitzt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus wenig EtOH umkristallisiert.

<i>Ausbeute:</i>	319 mg (33%)
<i>Summenformel:</i>	C ₁₇ H ₁₄ ClNO ₂ S
<i>Molmasse:</i>	331.82 g/mol
<i>Aussehen:</i>	farbloser, nadelig-kristalliner Feststoff
<i>Bezeichnung:</i>	AL958, ST-1829
<i>R_F-Wert:</i>	0.72 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃):	δ = 10.57 (s, 1H, -OH), 7.78 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,6H-PhCl), 7.49 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 3H,5H-PhCl), 7.17 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,6H-PhOMe), 6.86 (d, 2H, ³ J = 8.7 Hz, 3H,5H-PhOMe), 3.91 (s, 2H, CH ₂), 3.72 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 158.4, 157.7, 133.9, 132.4, 132.0, 129.1, 126.4, 113.8, 109.0, 54.9, 28.8.
<i>Schmelzpunkt:</i>	148.1 °C
<i>ESI-MS:</i>	m/z = 332.1, 334.2 [M+H] ⁺
<i>CHN:</i>	Ber.: C 61.53, H 4.25, N 4.22, S 9.66 Gef.: C 61.64, H 4.28, N 4.20, S 9.80

8. Experimenteller Teil - 8.2 Synthese der 5-LO-Inhibitoren

2-(4-Chlorphenyl)-5-(4-methoxyphenyl)thiazol-4-ol (ST-1748 (494))^{nach [412,418]}

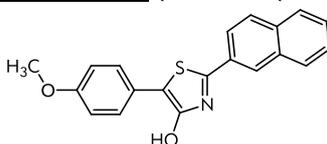


Eine Mischung aus 378 mg 4-Chlorbenzonnitril (**491**) (2.75 mmol, 1.0 eq), 545 mg 2-Mercapto-2-(4-methoxyphenyl)essigsäure (**486**) (2.75 mmol, 1.0 eq) und 1 mL Triethylamin (7.21 mmol, 2.6 eq) wird für 25 min in der Mikrowelle auf 100 °C erwärmt.

Die gelbliche Mischung wird aus MeOH umkristallisiert.

Ausbeute:	293 mg (34%)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₂ S
Molmasse:	317.79 g/mol
Aussehen:	gelber, kristalliner Feststoff
Bezeichnung:	AL807, ST-1748
R _F -Wert:	0.74 (Hex/EE 1:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 11.40 (br s, 1H, -OH), 7.87 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,3H-PhCl), 7.65 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 3H,5H-PhOMe), 7.56 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz, 2H,6H-PhCl), 6.98 (d, 2H, ³ J = 8.9 Hz, 2H,6H-PhOMe), 3.77 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 157.7, 157.4, 156.7, 134.2, 131.7, 129.2, 127.3, 126.6, 123.9, 114.2, 55.0, 39.4.
Schmelzpunkt:	256 °C
ESI-MS:	m/z = 298.163 [M+H] ⁺
CHN:	Ber.: C 60.47, H 3.81, N 4.41, S 10.09 Gef.: C 60.48, H 3.79, N 4.32, S 10.13

5-(4-Methoxyphenyl)-2-(naphthalin-2-yl)thiazol-4-ol (ST-1828 (496))^{nach [412,418]}



Eine Mischung aus 368 mg 4-Naphtonitril (**495**) (2.52 mmol, 1.0 eq), 500 mg 2-Mercapto-2-(4-methoxyphenyl)essigsäure (**486**) (2.52 mmol, 1.0 eq) und 1.5 mL Triethylamin (10.82 mmol, 4.3 eq) wird für 25 min in der Mikrowelle auf 100 °C erwärmt.

Die gelbliche Mischung wird aus MeOH und aus MeOH/Et₂O umkristallisiert.

Ausbeute:	172 mg (20%)
Summenformel:	C ₂₀ H ₁₅ NO ₂ S
Molmasse:	333.40 g/mol
Aussehen:	kanariengelber, kristalliner Feststoff
Bezeichnung:	AL942, ST-1828
R _F -Wert:	0.35 (Hex/EE 2:1)
¹ H-NMR (250 MHz, DMSO-d ₆):	δ = 11.45 (s, 1H, -OH), 8.43 (s, 1H, 1H-Naphyl), 8.08-7.94 (m, 4H, 3H,6H,7H,8H-Naphyl), 7.68 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 3H,5H-PhOMe), 7.60-7.56 (m, 2H, 4H,5H-Naphyl), 7.00 (d, 2H, ³ J = 8.8 Hz, 2H,6H-PhOMe), 3.78 (s, 3H, -OCH ₃).
¹³ C-NMR (63 MHz, CDCl ₃):	δ = 158.2, 157.7, 157.5, 133.4, 132.8, 128.8, 128.4, 127.7, 127.3, 127.1, 127.0, 124.1, 124.1, 122.6, 114.3, 108.0, 55.1.
Schmelzpunkt:	258 °C
ESI-MS:	m/z = 332.1 [M-H] ⁻
CHN:	Ber.: C 72.05, H 4.53, N 4.20, S 9.62 Gef.: C 72.11, H 4.61, N 4.18, S 9.62

8.3. Absorptions- und Emissionsspektren

8.3.1 S1P₁-Liganden

Von allen synthetisierten fluoreszenzmarkierten S1P-Liganden wurde jeweils ein Absorption- und ein Emissionsspektrum in PBS-Puffer (Dulbecco's PBS (Cat No H15-001)), absolutem Ethanol und absolutem Dichlormethan aufgenommen.

Spektren in PBS-Puffer

Absorptions- und Emissionsspektrum der 4-DMAP-Derivate

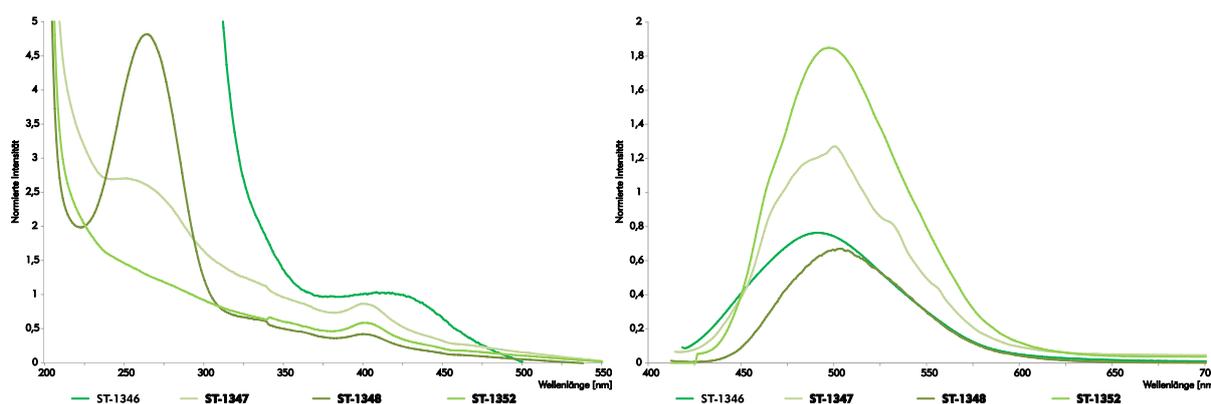


Abbildung 67: Konzentrationen für Absorption/Emission: ST-1346: 0.1 mM; ST-1347: 0.02 mM; ST-1348: 0.02 mM; ST-1352: 0.02 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Absorptions- und Emissionsspektrum aller anderen Derivate

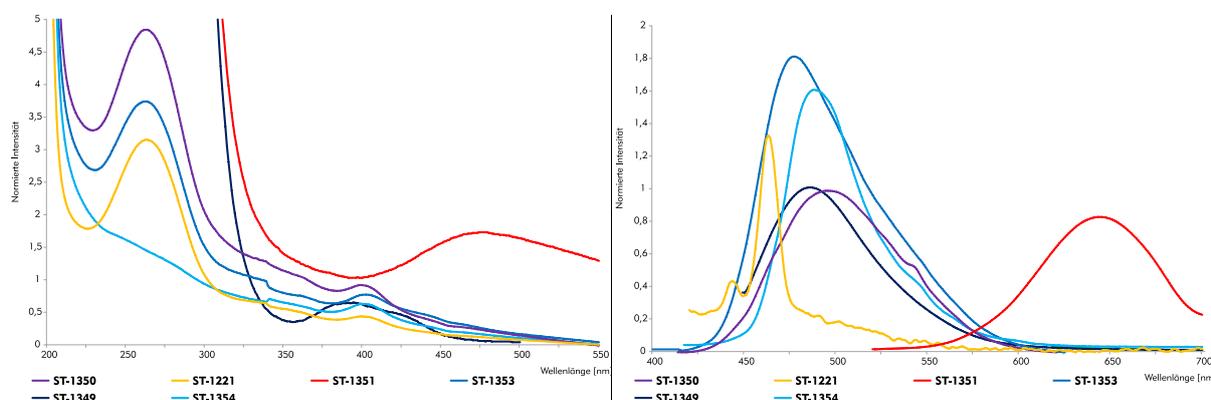


Abbildung 68: Konzentrationen für Absorption/Emission: ST-1346: 0.1 mM; ST-1349: 0.01/0.04 mM; ST-1353: 0.03 mM; ST-1350: 0.02 mM; ST-1221: 0.02 mM; ST-1351: 0.2/0.4 mM; ST-1354: 0.4/0.02 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Spektren in Ethanol

Absorptions- und Emissionsspektrum der 4-DMAP-Derivate

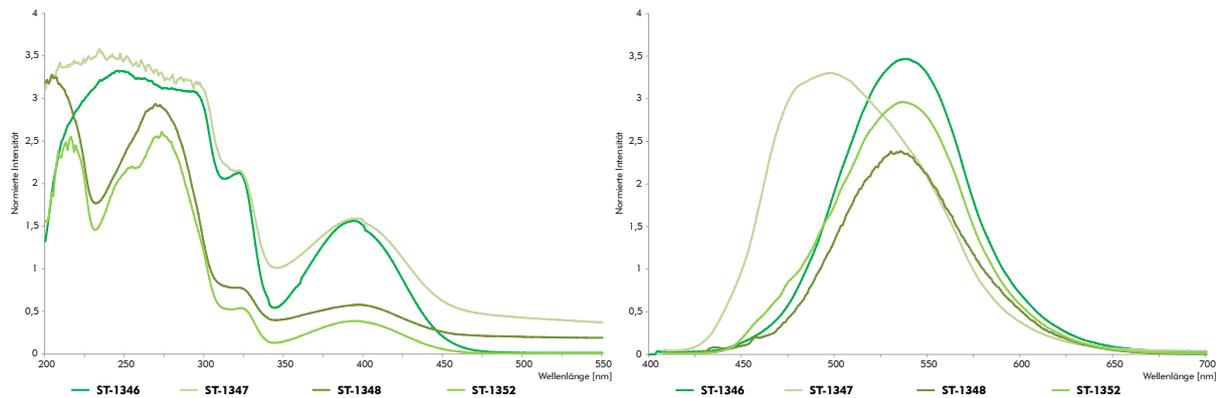


Abbildung 69: Konzentrationen für Absorption/Emission: **ST-1346:** 0.5 mM; **ST-1347:** 0.2 mM; **ST-1348:** 0.2 mM; **ST-1352:** 0.2 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Absorptions- und Emissionsspektrum aller anderen Derivate

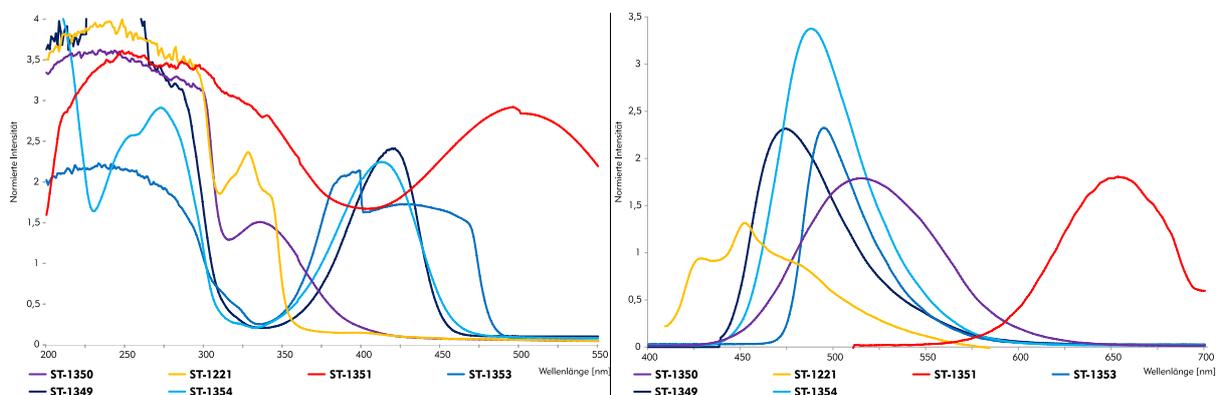


Abbildung 70: Konzentrationen für Absorption/Emission: **ST-1346:** 0.5 mM; **ST-1349:** 0.3/0.4 mM; **ST-1353:** 0.3 mM; **ST-1350:** 0.2 mM; **ST-1221:** 0.2 mM; **ST-1351:** 0.4 mM; **ST-1354:** 0.2 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Spektren in Dichlormethan

Absorptions- und Emissionsspektrum der 4-DMAP-Derivate

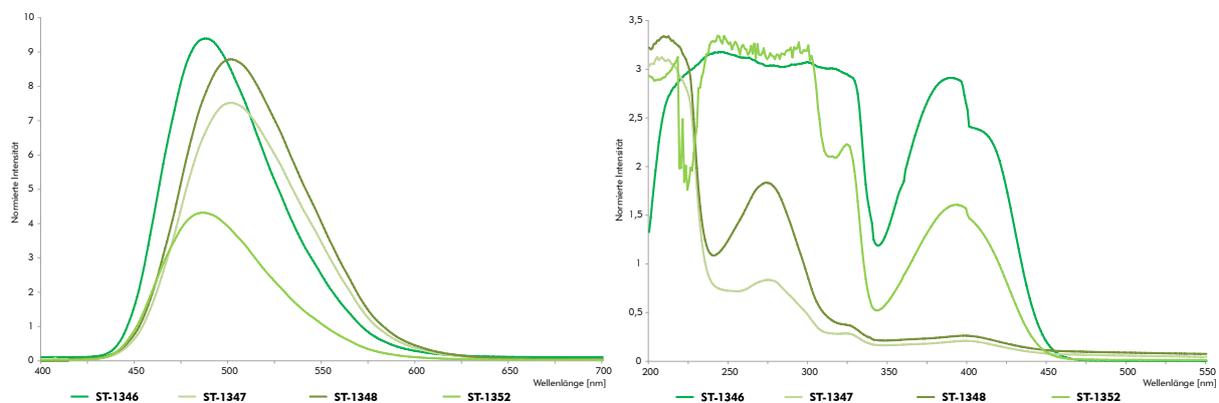


Abbildung 71: Konzentrationen für Absorption/Emission: **ST-1346:** 0.4 mM; **ST-1347:** 0.02 mM; **ST-1348:** 0.01 mM; **ST-1352:** 0.2 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Absorptions- und Emissionsspektrum aller anderen Derivate

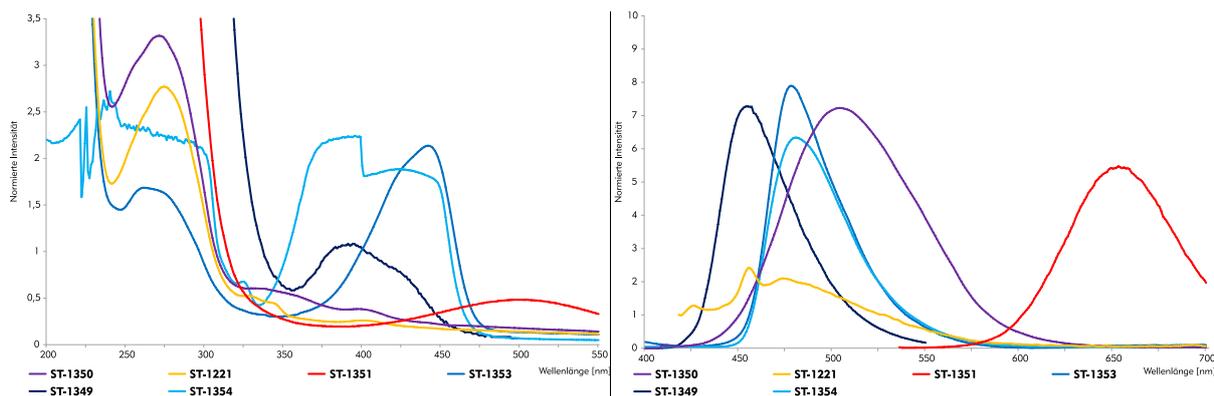


Abbildung 72: Konzentrationen für Absorption/Emission: **ST-1346:** 0.4 mM; **ST-1349:** 0.01 mM; **ST-1353:** 0.015 mM; **ST-1350:** 0.01 mM; **ST-1221:** 0.01 mM; **ST-1351:** 0.01 mM; **ST-1354:** 0.2 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Tabelle 14: Emissions- und Absorptionsmaxima der S1P₁-Liganden in PBS-Puffer, Ethanol und Dichlormethan

Fluorophor	Code (Substanznr.)	PBS-Puffer		Ethanol		Dichlormethan	
		$\lambda_{\max}(\text{abs})$	$\lambda_{\max}(\text{em})$	$\lambda_{\max}(\text{abs})$	$\lambda_{\max}(\text{em})$	$\lambda_{\max}(\text{abs})$	$\lambda_{\max}(\text{em})$
4-DMAP	ST-1346 (234)	408 nm	491 nm	394 nm	538 nm	390 nm	487 nm
	ST-1347 (238)	399 nm	500 nm	396 nm	498 nm	399 nm	501 nm
	ST-1348 (240)	399 nm	504 nm	397 nm	533 nm	399 nm	501 nm
	ST-1352 (242)	399 nm	497 nm	394 nm	536 nm	393 nm	486 nm
Dansyl	ST-1350 (209)	399 nm	495 nm	337 nm	515 nm	398 nm	504 nm
Isoindolin	ST-1221 (210)	399 nm	463 nm	329 nm	452 nm	399 nm	474 nm
Pyrylium	ST-1351 (217)	495 nm	644 nm	485 nm	649 nm	500 nm	653 nm
Coumarin	ST-1353 (271)	400 nm	477 nm	395 nm	495 nm	400 nm	478 nm
	ST-1349 (214)	395 nm	486 nm	418 nm	474 nm	395 nm	455 nm
	ST-1354 (255)	400 nm	488 nm	412 nm	488 nm	395 nm	480 nm

8.3.2 S1P₁-Liganden mit optimierter Leitstruktur

Spektren in PBS-Puffer

Absorptions- und Emissionsspektrum

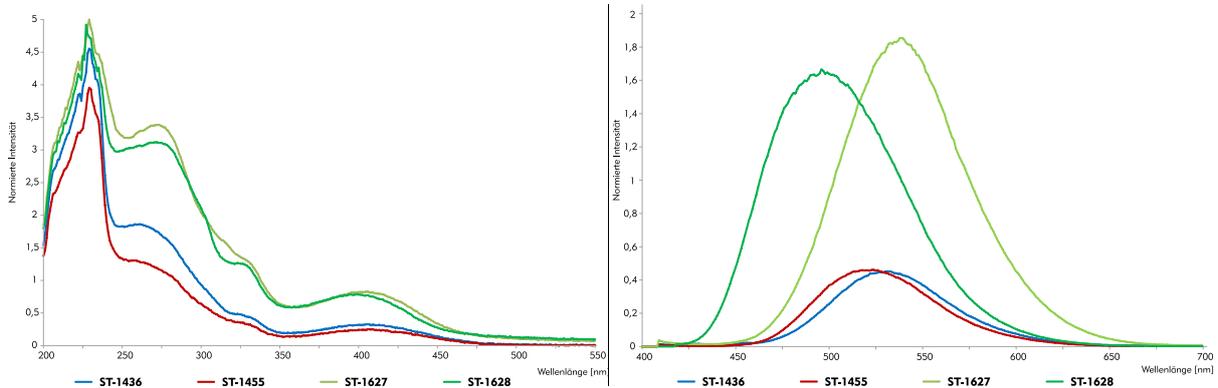


Abbildung 73: Konzentrationen für Absorptions/Emission: 0.1 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Spektren in Ethanol

Absorptions- und Emissionsspektrum

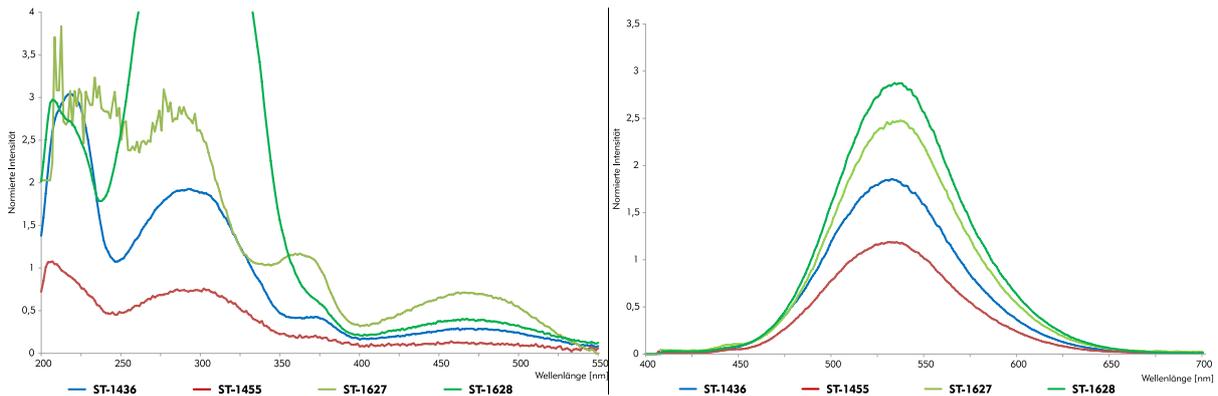


Abbildung 74: Konzentrationen für Absorptions/Emission: ST-1436 / ST-1455 / ST-1627: 0.1 mM; ST-1628: 0.02 mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Spektren in Dichlormethan

Absorptions- und Emissionsspektrum

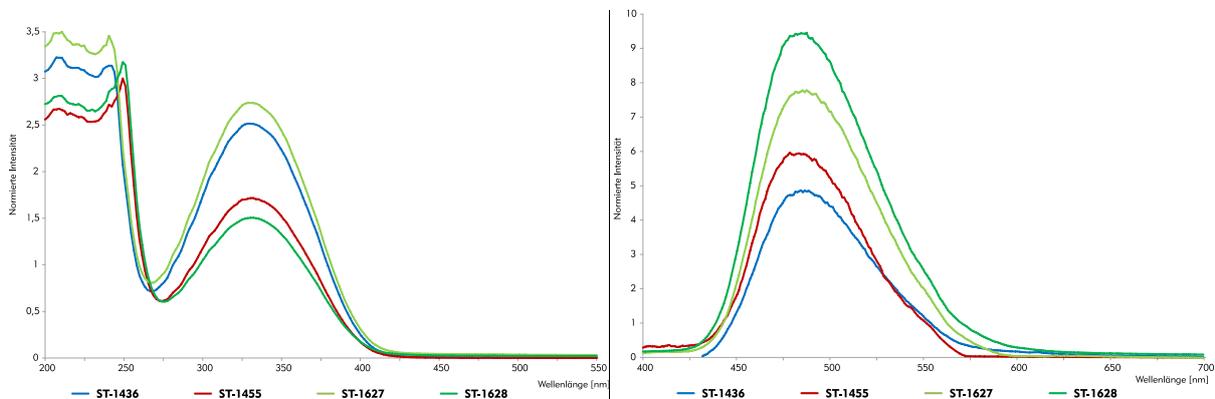


Abbildung 75: Konzentrationen für Absorptions/Emission: ST-1436 / ST-1627: 0.1 mM; ST-1455 / ST-1628: 1mM; Anregung im jeweiligen höchstem Absorptionsmaximum.

Tabelle 15: Emissions- und Absorptionsmaxima der SIP₁-Liganden mit optimierter Grundstruktur in PBS-Puffer, Ethanol und Dichlormethan

Fluorophor	Code (Substanznr.)	PBS-Puffer		Ethanol		Dichlormethan	
		$\lambda_{\max}(\text{abs})$	$\lambda_{\max}(\text{em})$	$\lambda_{\max}(\text{abs})$	$\lambda_{\max}(\text{em})$	$\lambda_{\max}(\text{abs})$	$\lambda_{\max}(\text{em})$
4-DMAP	ST-1436 (234)	390 nm	458 nm	390 nm	538 nm	275 nm	486 nm
	ST-1455 (238)	390 nm	455 nm	390 nm	533 nm	275 nm	486 nm
	ST-1627 (240)	390 nm	538 nm	390 nm	533 nm	275 nm	486 nm
	ST-1628 (242)	390 nm	496 nm	390 nm	535 nm	275 nm	486 nm

8.3.3 Absorptionsspektren der 5-LO-Inhibitoren zum kovalenten Labeling

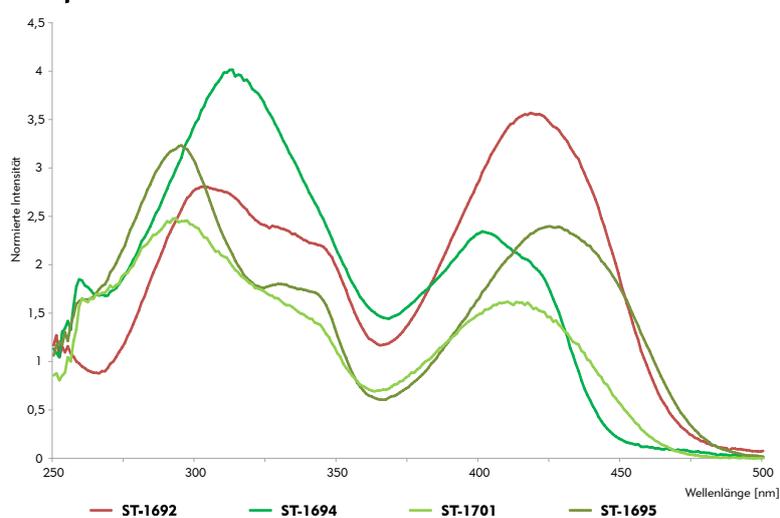


Abbildung 76: Absorptionsspektren von **ST-1692** (391), **ST-1694** (394), **ST-1701** (398) und **ST-1695** (401) in DMSO (5 mM).

Tabelle 16: Emissions- und Absorptionsmaxima der zum kovalenten Labeling fähigen 5-LO-Inhibitoren

Reaktive Gruppe	Code (Substanznr.)	$\lambda_{\max}(\text{abs})$
Azid	ST-1692 (391)	416 nm
	ST-1694 (394)	401 nm
Benzophenon	ST-1701 (398)	410 nm
	ST-1695 (401)	415 nm

8.4 Pharmakologische Testung

8.4.1 Protokoll der Internalisierungsversuche mit GFP-S1P₁ transfizierten HEK-293-Zellen

- 8-wells mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml in DPBS) beschichten
- HEK-293 Zellen aussäen, sodass Zellen zu ca. 50 % konfluent sind
- Transfektion mit Lipofectamine® 2000 nach Herstellerangaben^[459]
 - 0,4 µg DNA/well und 0,5 µl Lipofectamin 2000/well
 - Transfektion für 6 h
- 48 h unter normalen Bedingungen kultivieren
- Serumfrei für 16 h
- 2 h mit 1 µM der Testsubstanzen stimulieren
 - Positivkontrolle 1 µM S1P mit 1 mg/ml BSA
 - Negativkontrolle MeOH und DMSO
- am Laser-Scanning-Mikroskop analysieren (Anregung 488 nm, Emissionsfilter 505-530 nm)

8.4.2 Präparation der Polymorphonuklearen Leukozyten

Venöses Blut von freiwilligen, gesunden Spendern (Städtische Kliniken Frankfurt Höchst) wird bei 4,000 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Isolierung der PMNL erfolgt durch sofortige Dextranedimentation, Zentrifugation und hypertonen Aufschluss der Erythrozyten.^[429] Die isolierten PMNL werden anschließend in PBS-Puffer (pH 7.4), der 1 mg/mL Glucose enthält, suspendiert.^[249]

8.4.3 Bestimmung der 5-LO-Produktbildung in Polymorphonuklearen Leukozyten

Frisch isolierte PMNL (5×10^6) werden in 1 mL PBS-Puffer (pH 7.4, enthält 1 mg/mL Glucose und 1 mM CaCl₂) aufgenommen. Nach einer Vorinkubation mit den Testsubstanzen für 15 Minuten bei 37 °C wird die 5-LO-Produktbildung durch Zugabe von Calcium-Ionophore A23187 (2.5 µM) und exogener Arachidonsäure (20 µM) stimuliert. Der Zusatz von exogener Arachidonsäure soll eventuelle Limitierungen an bereitgestellter Arachidonsäure durch die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) entgegenwirken. Die Reaktion wird nach 10 Minuten bei 37 °C durch 1 mL Methanol gestoppt. Dann werden 30 µL 1M HCl und 200 ng Prostaglandin B₁, als interner Standard, zugegeben. Nach Zentrifugation bei 800 g für 10 Minuten werden die 5-LO-Produkte aus dem Überstand durch C18 Festphasensäulen extrahiert und per HPLC analysiert.^{[460], [428]}

Die 5-LO-Produkte – Leukotriene B₄ (LTB₄), sein komplett *trans*-Isomer und 5-H(P)ETE (5(S)-Hydro(pero)xy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraenesäure – werden dabei in ng pro 10⁶ Zellen gemessen. Die Cysteinyl LT C₄, D₄ und E₄ genauso wie die Oxidationsprodukte von LTB₄ werden dabei nicht berücksichtigt. Jede Verbindung wird dabei wenigsten drei Mal vermessen.^[249]

8.4.4 Bestimmung der 5-LO-Produktbildung im zellfreien Assay (S100)

Frisch isolierte PMNL werden in 1 mL PBS-Puffer mit 1 mM EDTA, 60 µg/mL des Proteaseinhibitors Soybean trypsin inhibitor, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 10 µg/mL Leupeptine aufgenommen, 10 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4 °C für dreimal 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Das Homogenat wird 70 Minuten bei 4 °C und 100,000 g zentrifugiert. Das erhaltene S100, das 7.5×10^6 PMNL enthält, wird in einem mL Reaktionsmix (PBS-Puffer, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1 mM ATP) aufgenommen und mit den Testverbindungen für 15 Minuten bei 4 °C vorinkubiert. Die 5-LO Reaktion wird bei 37 °C durch Zugabe von 20 µM Arachidonsäure und 2 mM CaCl₂ gestartet. Nach 10 Minuten wird sie durch Zugabe von 1 mL kaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte werden wie bei dem PMNL-Assay analysiert. Jede Verbindung wird dabei wenigsten drei Mal vermessen.^[249]

8.4.5 Bestimmung der 5-LO-Produktbildung mit Wash-Out

PMNL wash-out

Frisch isolierte PMNL (5×10^6) wurden in 1 mL PBS suspendiert und mit **ST-1631 (389)** bzw. **ST-1500 (388)** ($1 \mu\text{M}$) für 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Für den wash-out Versuch wurde 1 mL PBS zugesetzt und die Zellen wurden für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand mit ausgewaschenem Inhibitor wurde verworfen und der Zellrückstand wurde in 1 mL PBS aufgenommen. Die 5-LO Reaktion wurde wie im normalen PMNL-Assay gestartet und analysiert, wobei in einer Restock Probe erneut Inhibitor hinzugegeben wurde um den Einfluss der Zentrifugation auszuschließen.

Zellfreier wash-out

Aufgereinigte 5-LO ($3\text{--}4\ \mu\text{g}$) wurde in $100\ \mu\text{L}$ Reaktionsmix (PBS pH 7.4, 1 mM ATP, $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ γ -Globulin) mit **ST-1631 (389)** bzw. **ST-1500 (388)** ($1 \mu\text{M}$) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für den wash-out Versuch wurden die Proben zehnfach mit PBS verdünnt bzw. für den Restock wurde erneut Inhibitor zugesetzt. Die 5-LO Reaktion wurde wie im S100-Assay beschrieben gestartet und analysiert.

9. Abkürzungen

¹ H-NMR	Protonen-Kernresonanzspektroskopie
¹³ C-NMR	¹³ C-Kernresonanzspektroskopie
δ	Chemische Verschiebung [ppm]
μw	Mikrowellensynthese
1,25(OH) ₂ D ₃	1α,25-Dihydroxyvitamin-D ₃
4-DMAP	4-Dimethylaminophthalimid
5-LO	5-Lipoxygenase
AA	Arachidonsäure
ABC Transporter	ATP-Binding Cassette Transporter
abs.	absolut (wasserfrei)
AC	adenylyl cyclase
AcCl	Acetylchlorid
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
Akt	protein-serine/threonine kinase
APC	Antigenpräsentierenden Zellen
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
Ber.	Berechnet
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLT _{1/2}	Leukotrien B ₄ Rezeptor 1/2
br s	breites Singulett
C1/2 Domäne	konservierte Region 1/2
C1P	Ceramid-1-Phosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCR7	C-C chemokiner Rezeptor Typ 7
CDase	Ceramidase
Cer	Ceramid
CerS	Ceramidsynthase
CERT	Ceramid Transportprotein
CFTR	Zystische Fibrose transmembrärer Regulator
CK	Ceramidkinase
CLP	Coactosin-like Protein
CoA	Coenzym A
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
CTGF	Verbindender Gewebswachstumsfaktor (engl. connective tissue growth factor)
cw	continuous wave
CYP450	Cytochrom P450
Cys-LT	Cysteinyl Leukotriene
d	Dublett
DAG	Diacylglycerol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

9. Abkürzungen

DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMR	dynamische Masseumverteilung (engl. dynamic mass redistribution)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DsCl	Dansylchlorid
dt	Dublett von Triplett
ECL	Extra-zellulärer Loop
EDC(*HCl)	<i>N</i> ¹ -((Ethylimino)methylen)- <i>N</i> ³ , <i>N</i> ³ -dimethylpropan-1,3-diamin(hydrochlorid)
EDG	endothelial differentiation gene
EE	Ethylacetat
EET	Epoxyeicosatetraensäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (engl. endothelial nitric oxide synthase)
EPR	Elektron Paramagnetische Resonanzstudien
eq	Äquivalente
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
Et ₂ O	Diethyether
EtOH	Ethanol
EWG	Elektronenziehende Gruppe (engl. electron-withdrawing group)
FABP4	Fettsäure-bindendes Protein-4
FCS	fetales Kälberserum
FcεRI	hochaffiner IgE Rezeptor
FFA	freie Fettsäure
FLAP	Fünf-LO-Aktivierende Protein
fMLP	<i>N</i> -Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GCase	Glycosylceramidase
GCS	Glycosylceramidsynthase
Gef.	Gefunden
GEF	growth factor (Wachstumsfaktor)
ges.	gesättigt Lösung
GF	Guaninnukleotid Austauschfaktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen colony-stimulierender Faktor
GPCR	G Protein-gekoppelten Rezeptors
GSH	Glutathion
HDAC	Histondeacetylasen
HDL	high density Lipoprotein

9. Abkürzungen

HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HEx	Hexan
His	Histidin
HOAc	Essigsäure
HOBt*H ₂ O	1H-Benzo[d] [1,2,3]triazol-1-ol · Monohydrat
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunoglobulin
IGF	Insulin growth factor
IKACH	inward-rectifying potassium channel
IKK	Inhibitor von NF-κB
IL	Interleukin
Ins(1,4,5)P3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
<i>J</i>	Kopplungskonstante
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kat.	katalytisch
konz.	konzentrierte
KSR	3-Ketosphingarinreduktase
Lass	Longevity Assurance Genes (andere Bezeichnung für CerS)
LDA	Lithiumdiisopropylamin
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
Leu	Leucin
LOX	Lipoxygenasen
LPA	Lysophosphatsäure
LPP	unspezifische Lipid Phosphat Phosphatase
LT	Leukotrienen
LTA ₄ /B ₄ /C ₄ /D ₄ /E ₄	Leukotrien A ₄ /B ₄ /C ₄ /D ₄ /E ₄
LXA ₄	Lipoxin A ₄
LXR	Leber X-Rezeptor
Lys	Lysin
m	Multipllett
MAPK	mitogen-activated protein Kinase
mCPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minute(n)
MK	MAP kinase-activated protein kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
mTOR(C)	humaner Ziel von Rapamycin (Komplex) [engl. mammalian target of rapamycin (complex)]

9. Abkürzungen

NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NFκB	Nuclear Faktor κB
NIS	nukleäre Importsequenzen
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NO	Stickstoffmonoxid
NPP	Nukleotide-pyrophosphatase / Phosphodiesterase
NSD	nSMase Domäne
nSMase	neutral Sphingomyelinase
NucRs	nukleären Rezeptoren
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
ODG	Oligodendrozyten
OER	Östrogenrezeptor
PAF	Platelet Aktivierender Faktor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGH ₂ S	ProstaglandinH ₂ Synthase
PDK1	Phosphoinositid-anhängige Kinase-1
PET	Positronen Emission Tomographie
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
Ph	Phenyl
PH	Pleckstrin Homologie
Phe	Phenylalanin
Pht	Phthalimid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PI3Kc	katalytische Einheit der PI3K
PKA/B/C	Proteinkinase A/B/C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMNL	Polymorphonukleare Leukozyten
PPAR	Peroxisome Proliferator Aktivierte Rezeptor
pq	Pseudoquartett
pt	Pseudotriplett
PtdIns(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PtdIns(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PTEN	Phosphatase und Tensin Homologue
pTyr	phosphoryliertes Tyrosin
Py	Pyridin
q	Quartett
quant.	quantitativ
qui	Quintett
Rac	kleinen GTPasen
Rapa	Rapamycin

9. Abkürzungen

RAR	Retinsäurerezeptor;
Ras	kleinen GTPasen
R _f -Wert	ratio of fronts (Dünnschichtchromatographie)
Rheb	Ras homologue enriched in brain
Rho	kleinen GTPasen
ROCK	RhoA-associated kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR-MS	schubförmig remittierende Multiples Sklerose (engl. Relapsing-remitting)
Raumtemperatur	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Rezeptor
s	Singulett
S100	100000 x g Überstand von PMNL Homogenaten
S ₁ P	Sphingosin-1-phosphat
S ₁ PR	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
Ser	Serin
SH	Src (sarcoma) Homologie
SHIP1	SH2 Inositol-5-phosphatase-1
SK1/2	Sphingosinkinase 1/2
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SMS	Sphingomyelinsynthase
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomographie
Sph	Sphingosin
SPNS2	Spinster homolog 2
SPPase	Sphingosinphosphat Phosphatase
SPT	Serin-Palmitoyltransferase
t	Triplett
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TCM	zentrale Gedächtniszellen
TEM	Effektor Gedächtniszellen
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Triacylglycerol
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
T _H	T-Helferzellen
THF	Tetrahydrofuran
T _K	T-Killerzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
T _n	naiven T-Zellen
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg}	von regulatorischen T-Zellen
TSC	Tuberöse Sklerose Komplex
Tyr	Tyrosin
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

9. Abkürzungen

WST	wasserlösliches Tetrazolium (engl. water soluble tetrazolium)
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Literaturverzeichnis

- [1] M. P. Wymann, R. Schneiter, Lipid signalling in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9*, 162-176.
- [2] T. Shimizu, Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2009**, *49*, 123-150.
- [3] G. S. Hotamisligil, Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **2006**, *444*, 860–867.
- [4] N. J. Pyne, S. Pyne, Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer* **2010**, *10*, 489-503.
- [5] TargetingLipidSignallingInDisease, www.nature.com/nrm/posters/lipidsignalling-disease, **Zugriff 2008**.
- [6] M. P. Wymann, M. Zvelebil, M. Laffargue, Phosphoinositide 3-kinase signalling — which way to target? *TRENDS in Pharmacological Sciences* **2003**, *24*, 366-376.
- [7] J. A. Engelman, J. Luo, L. C. Cantley, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics* **2006**, *7*, 606–619.
- [8] S. Spiegel, S. Milstien, K. Takabe, S. W. Paugh, “Inside-Out” Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets. *Pharmacologic Reviews* **2008**, *60*, 181-195
- [9] H. Rosen, E. J. Goetzl, Sphingosine 1-Phosphate and its Receptors: An autocrine and paracrine Network. *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5*, 560.
- [10] H. Nakamura, T. Murayama, The Role of Sphingolipids in Arachidonic Acid Metabolism. *Journal of Pharmacological Sciences* **2014**, *124*, 307-312.
- [11] C. A. Rouzer, L. J. Marnett, Endocannabinoid Oxygenation by Cyclooxygenases, Lipoxygenases, and Cytochromes P450: Cross-Talk between the Eicosanoid and Endocannabinoid Signaling Pathways. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 5899-5922.
- [12] A. Chawla, J. J. Repa, R. M. Evans, D. J. Mangelsdorf, Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **2001**, *294*, 1866-1870.
- [13] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda, I. Shimomura, Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *114*, 1752–1761.
- [14] J. S. Bromberg, G. J. Randolph, A. C. Yopp, Leukotrienes, Sphingolipids, and Leukocyte Trafficking. *The Journal of Immunology* **2003**, *171*, 5-10.
- [15] S. Bergström, H. Danielsson, B. Samuelsson, The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1963**, *901*.
- [16] B. Samuelsson, E. Granström, K. Green, M. Hamberg, S. Hammarström, Prostaglandins. *Annual Review of Biochemistry* **1975**, *44*, 669-695.
- [17] B. Samuelsson, Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation. *Science* **1983**, *220*, 568-575.
- [18] B. Samuelsson, S. Bergström, H. Danielsson, The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. *Biochimica et Biophysica Acta* **1964**, *90*, 207-210.
- [19] J. W. Hinman, Prostaglandins. *Annual Review of Biochemistry* **1972**, *41*, 161-178.
- [20] J. Z. Haeggström, C. D. Funk, Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 5866–5898.
- [21] C. D. Funk, Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* **2001**, *294*, 1871-1875.
- [22] M.-J. Lee, J. R. V. Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, T. Hla, Sphingosine-1-Phosphate as a Ligand for the G Protein-Coupled Receptor EDG-1. *Science* **1998**, *279*, 1552-1555.
- [23] L. M. Obeid, Y. A. Hannun, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9*, 139.
- [24] G. T. Kunkel, M. Maceyka, S. Milstien, S. Spiegel, Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*, 688-702.
- [25] E. A. Dennis, E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. v. Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **2005**, *46*, 839-861.

- [26] A. Lill, H. Stark, Sphingolipide - Fettähnliche Botenstoffe mit großer Wirkung. *PZ Prisma* **2012**, *19*, 17-27.
- [27] H. Rosen, D. Marsolais, Chemical Modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8*, 297-307.
- [28] L. J. Pike, The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research* **2009**, *50*, S323-S328.
- [29] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2000**, *1*, 31-41.
- [30] K. Simons, D. Lingwood, Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* **2010**, *327*, 46-50.
- [31] C. D. Funk, Leukotriene Modifiers as Potential Therapeutics for Cardiovascular Disease. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 664-672.
- [32] S. Spiegel, S. Milstien, Sphingosine-1-Phosphate: An Enigmatic Signalling Lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2003**, *4*, 397-407.
- [33] P. Nussbaumer, Medicinal Chemistry Aspects of Drug Target in Sphingolipid Metabolism. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 543.
- [34] J. C. M. Holthuis, F. G. Tafesse, P. Ternes, The Multigenic Sphingomyelin Synthase Family. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 29421-29425.
- [35] M. Nikolova-Karakashian, S. Lightle, R. Tosheva, A. Lee, J. Queen-Baker, B. Boyanovsky, S. Shedlofsky, Elevation of ceramide in serum lipoproteins during acute phase response in humans and mice: role of serine-palmitoyl transferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003**, *419*, 120-128.
- [36] A. Nilsson, R.-D. Duan, Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *Journal of Lipid Research* **2006**, *47*, 154-171.
- [37] H. Rosen, P. J. Gonzalez-Cabrera, M. G. Sanna, S. Brown, Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78*, 743.
- [38] T. Hla, V. A. Blaho, Regulation of Mammalian Physiology, Development, and Disease by the Sphingosine 1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid Receptors. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 6299-6320.
- [39] Y. Yatomi, T. Ohmori, G. Rile, F. Kazama, H. Okamoto, T. Sano, K. Satoh, S. Kume, G. Tigyi, Y. Igarashi, Y. Ozaki, Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* **2000**, *96*, 3431-3438.
- [40] R. Alemany, C. J. v. Koppen, K. Danneberg, M. t. Braak, D. M. z. Heringdorf, Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2007**, *374*, 413.
- [41] B. W. Wattenberg, Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World Journal of Biological Chemistry* **2010**, *1*, 362-368.
- [42] G. M. Strub, M. Maceyka, N. C. Hait, S. Milstien, S. Spiegel, Extracellular and Intracellular Actions of Sphingosine-1-Phosphate. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2010**, *688*, 141-155.
- [43] J. Igarashi, T. Michel, The Enigma of Sphingosine 1-Phosphate Synthesis: A Novel Role for Endothelial Sphingosine Kinases. *Circulation Research* **2008**, *102*, 630-632.
- [44] http://www.spiritweb.us/egypt/Anubis_standing.jpg, Zugriff am 08.03.2011.
- [45] A. Gómez-Muñoz, L. Arana, P. Gangoiti, A. Ouro, M. Trueba, Review Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. *Lipids in Health and Disease* **2010**, *9*, 1-12.
- [46] W. Stoffel, G. Heimann, B. Hellenbach, Sphingosine Kinase in Blood Platelets. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1973**, *354*, 562-566.
- [47] J. Rivera, R. L. Proia, A. Olivera, The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nature Reviews Immunology* **2008**, *8*, 753-763.
- [48] M. H. Gräler, M. v. d. Giet, C. Bode, S.-C. Sensken, U. Peest, G. Beutel, F. Thol, B. Levkau, Z. Li, R. Bittman, T. Huang, M. Tölle, Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *Journal of Cellular Biochemistry* **2010**, *109*, 1232-1243.
- [49] J. D. Saba, H. Fyrst, An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nature Chemical Biology* **2010**, *6*, 489-497.
- [50] A. Kihara, K. Ito, Y. Anada, M. Tania, M. Ikeda, T. Sano, Y. Igarashi, Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *357*, 212-217.
- [51] M. H. Gräler, P. Andréani, P. Hänel, Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *The FASEB Journal* **2007**, *21*, 1202-1209.

- [52] S. Spiegel, R. H. Kim, K. Takabe, S. Milstien, Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1791, 692-696.
- [53] A. Gómez-Muñoz, L. Arana, P. Gangoiiti, A. Ouro, M. Trueba, Ceramide and ceramide-1-phosphate in health and disease. *Lipids in Health and Disease* **2010**, 9, 1-12.
- [54] G. Fabrias, D. Delgado, J. Casas, A. Liebaria, J. L. Abad, Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, 1758, 1957-1977.
- [55] H.-P. Deigner, R. Claus, G. A. Bonaterra, C. Gehrke, N. Bibak, M. Blaess, M. Cantz, J. Metz, R. Kinscherf, Ceramide induces α SMase expression: implications for oxLDL-induced apoptosis. *The FASEB Journal* **2001**, 15, 807-814.
- [56] S. A. Young, J. G. Mina, P. W. Denny, T. K. Smith, Sphingolipid and Ceramide Homeostasis: Potential Therapeutic Targets. *Biochemistry Research International* **2012**, Article ID 248135, 1-12.
- [57] N. L. Rao, P. J. Dunford, X. Xue, X. Jiang, K. A. Lundeen, F. Coles, J. P. Riley, K. N. Williams, C. A. Grice, J. P. Edwards, Lars Karlsson, A. M. Fourie, Anti-Inflammatory Activity of a Potent, Selective Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitor in Comparison with the 5-Lipoxygenase Inhibitor Zileuton. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2007**, 321, 1154-1160.
- [58] K. Sandhoff, T. Kolter, Sphingolipide - ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen. *Angewandte Chemie* **1999**, 111, 1632-1671.
- [59] T. Kobayashi, T. Shimizugawa, T. Osakabe, S. Watanabe, H. Okuyama, A long term feeding of sphingolipids affected the levels of plasma cholesterol and hepatic triacylglycerol but not tissue phospholipids and sphingolipids. *Nutrition Research* **1997**, 17, 111-114.
- [60] R. G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, W. A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J. C. Troncoso, M. P. Mattson, Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, 101, 2070-2075.
- [61] X. He, Y. Huang, B. Li, C.-X. Gong, E. H. Schuchman, Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **2010**, 31, 398-408.
- [62] N. F. Lamour, R. V. Stahelin, D. S. Wijesinghe, M. Maceyka, E. Wang, J. C. Allegood, J. Alfred H. Merrill, W. Cho, C. E. Chalfant, Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis. *Journal of Lipid Research* **2007**, 48, 1293-1304.
- [63] M. A. Hanson, C. B. Roth, E. Jo, M. T. Griffith, F. L. Scott, G. Reinhart, H. Desale, B. Clemons, S. M. Cahalan, S. C. Schuerer, M. G. Sanna, G. W. Han, P. Kuhn, H. Rosen, R. C. Stevens, Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* **2012**, 335, 851-855.
- [64] H. Rosen, R. C. Stevens, M. Hanson, E. Roberts, M. B. A. Oldstone, Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: Structure, Signaling, and Influence. *Annual Review of Biochemistry* **2013**, 82, 637-662.
- [65] L. M. Obeid, T. A. Taha, K. M. Argraves, Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, 1682, 48-55.
- [66] A. Bar-Or, M. Mehling, T. A. Johnson, J. Antel, L. Kappos, Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology* **2011**, 76, S20-S27.
- [67] S. Mandala, R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G.-J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C. L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons, H. Rosen, Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists. *Science* **2002**, 296, 346-349.
- [68] M. v. d. Giet, M. Tolle, B. Levkau, B. Kleuser, Sphingosine-1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds. *European Journal of Clinical Investigation* **2007**, 37, 171-179.
- [69] S.-C. Sensken, M. H. Gräler, Sphingolipide und deren medizinische Bedeutung. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **2009**, 134, 259.
- [70] V. Brinkmann, Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* **2007**, 115, 84-105.
- [71] P. Puneet, C. T. Yap, L. Wong, L. Yulin, D. R. Koh, S. Mochhala, J. Pfeilschifter, A. Huwiler, A. J. Melendez, SphK1 Regulates Proinflammatory Responses Associated with Endotoxin and Polymicrobial Sepsis. *Science* **2010**, 238, 1290-1294.
- [72] L. A. J. O'Neill, Stopping Sepsis by Targeting Sphingosine Kinase 1. *Science Translational Medicine* **2010**, 2, 36ps29.

- [73] F. Niessen, F. Schaffner, C. Furlan-Freguia, R. Pawlinski, G. Bhattacharjee, J. Chun, C. K. Derian, P. Andrade-Gordon, H. Rosen, W. Ruf, Dendritic cell PAR1–S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature Letters* **2008**, *452*, 654-658.
- [74] A. Huwiler, J. Pfeilschifter, New players on the center stage: Sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochemical Pharmacology* **2008**, *75*, 1893-1900.
- [75] Y.-H. Lien, K.-C. Yong, C. Cho, S. Igarashi, L.-W. Lai, S1P1-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure. *Kidney International* **2006**, *69*, 1601-1608.
- [76] V. Brinkmann, A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhye, Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9*, 883-897.
- [77] A. Delgado, J. Casas, A. Llebaria, J. L. Abad, a. G. Fabrias, Chemical Tools to Investigate Sphingolipid Metabolism and Functions. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 580-606.
- [78] J. J. Hale, C. L. Lynch, W. Neway, S. G. Mills, R. Hajdu, C. A. Keohane, M. J. Rosenbach, J. A. Milligan, G.-J. Shei, S. A. Parent, G. Chrebet, J. Bergstrom, D. Card, M. Ferrer, P. Hodder, B. Strulovici, H. Rosen, S. Mandala, A Rational Utilization of High-Throughput Screening Affords Selective, Orally Bioavailable 1-Benzyl-3-carboxyazetidine Sphingosine-1-phosphate-1 Receptor Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 6662–6665.
- [79] J. Goverman, Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology* **2009**, *9*, 393-407.
- [80] M. Sospedra, R. Martin, Immunology of Multiple Sclerosis. *Annual Review of Immunology* **2005**, *23*, 683-747.
- [81] V. Brinkmann, Daniel D. Pinschewer, D. Merkler, Impact of sphingosine 1-phosphate modulation on immune outcomes. *Neurology* **2011**, *76* S15-S19.
- [82] H. L. Weiner, R. S. Lopez-Diego, Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis — a multifaceted adversary. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7*, 909-925.
- [83] A. Lill, H. Stark, Multile Sklerose. *PZ Prisma* **2011**, *18*.
- [84] D. Piani, K. Frei, K. Q. Do, M. Cuénod, A. Fontana, Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neuroscience Letters* **1991**, *133*, 159-162.
- [85] European Medicines Agency, http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002202/WC500104528.pdf, **Zugriff am 04.04.2011**.
- [86] J. A. Cohen, M. A. Willis, Fingolimod Therapy for Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology* **2013**, *33*, 37-44.
- [87] A. Lill, A. Zivkovic, H. Stark, Multiple Sklerose: Fortschritt durch orale Therapien. *Pharmazeutische Zeitung* **2011**, *156*, 18-25.
- [88] C. Arenz, Small Molecule Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2010**, *26*, 1-8.
- [89] M. Kölzer, N. Werth, K. Sandhoff, Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Letters* **2004**, *559*, 96-98.
- [90] F. M. Awah, P. N. Uzoegwu, P. Ifeonu, J. O. Oyugi, J. Rutherford, X. Yao, F. Fehrmann, K. R. Fowke, M. O. Eze, Sphingomyelinase inhibitory and free radical scavenging potential of selected Nigerian medicinal plant extracts *Biokemistri* **2011**, *23*, 129-135.
- [91] E. Amtmann, N. Frank, G. Sauer, G. Schilling, New guanidine derivatives, methods of preparing them and their use as drugs. *EP0918750* **2002**.
- [92] X. Deng, H. Sun, X. Gao, H. Gong, W. Lu, Y. Chu, D. Ye, Development, Validation, and Application of a Novel Method for Mammalian Sphingomyelin Synthase Activity Measurement. *Analytical Letters* **2012**, *45*, 1581-1589.
- [93] D. Proksch, J. J. Klein, C. Arenz, Potent Inhibition of Acid Ceramidase by Novel B-13 Analogues. *Journal of Lipid Research* **2011**, *2011*, Article ID 971618.
- [94] C. Bedia, G. Triola, S. Grijalvo, J. Casas, A. Delgado, A. Llebaria, T. Levade, G. Fabriàs, Design and synthesis of acidic ceramidase inhibitors and their characterization using a novel fluorogenic substrate. *SPHINGOLIPID CLUB* <http://www.sphingolipidclub.com/component/content/article/15-non-categorizzato/abstracts/112-design-and-synthesis-of-acidic-ceramidase-inhibitors-and-their-characterization-using-a-novel-fluorogenic-substrate.html>.
- [95] N. Realini, C. Solorzano, C. Pagliuca, D. Pizzirani, A. Armirotti, R. Luciani, M. P. Costi, T. Bandiera, D. Piomelli, Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity. *Scientific Reports* **2013**, *3*, Article number: 1035.

- [96] S. M. Mandala, R. A. Thornton, B. R. Frommer, J. E. Curotto, W. Rozdilsky, M. B. Kurtz, R. A. Giacobbe, G. F. Bills, M. A. Cabello, I. Martin, F. Pelaez, G. H. Harris, Discovery of Australifungin, a Novel Inhibitor of Sphinganine N-Acyltransferase from *Sporormiella australis*. *The Journal of Antibiotics* **1995**, *48*, 349-356.
- [97] A. H. J. Merrill, G. van Echten, E. Wang, K. Sandhoff, Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 299-306.
- [98] J. T. Bagdanoff, M. S. Donoviel, A. Nouraldeen, M. Carlsen, T. C. Jessop, J. Tarver, S. Aleem, L. Dong, H. Zhang, L. Boteju, J. Hazelwood, J. Yan, M. Bednarz, S. Layek, I. B. Owusu, S. Gopinathan, L. Moran, Z. Lai, J. Kramer, S. D. Kimball, P. Yalamanchili, W. E. Heydorn, K. S. Frazier, B. Brooks, P. Brown, A. Wilson, W. K. Sonnenburg, A. Main, K. G. Carson, T. Oravec, D. J. Augeri, Inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase for the treatment of rheumatoid arthritis: discovery of (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-1H-imidazol-2-yl)ethanone oxime (LX2931) and (1R,2S,3R)-1-(2-(isoxazol-3-yl)-1H-imidazol-4-yl)butane-1,2,3,4-tetraol (LX2932). *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *53*, 8650-8662.
- [99] D. Plano, S. Amin, A. K. Sharma, Importance of Sphingosine Kinase (SphK) as a Target in Developing Cancer Therapeutics and Recent Developments in the Synthesis of Novel SphK Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, [dx.doi.org/10.1021/jm4011687](https://doi.org/10.1021/jm4011687).
- [100] M. R. Pitman, S. M. Pitson, Inhibitors of the Sphingosine Kinase Pathway as Potential Therapeutics. *Current Cancer Drug Targets* **2010**, *10*, 354-367.
- [101] M. H. Bolli, C. Lescop, O. Naylor, Synthetic Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators - Opportunities and Potential Pitfalls *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, 726-757.
- [102] Y. Kono, T. Eiraku, Benzothiophene derivatives, and S1P₄ receptor (sphingosine-1-phosphate receptor 4) modulators and pharmaceuticals containing them. *JP2008208034* **2008**.
- [103] A. Zivkovic, H. Stark, Efficient chromatography-free synthesis of the oxy-analogue of fingolimod. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 3769-3771.
- [104] M. Kiuchi, K. Adachi, T. Kohara, M. Minoguchi, T. Hanano, Y. Aoki, T. Mishina, M. Arita, N. Nakao, M. Ohtsuki, Y. Hoshino, K. Teshima, K. Chiba, S. Sasaki, T. Fujita, Synthesis and Immunosuppressive Activity of 2-Substituted 2-Aminopropane-1,3-diols and 2-Aminoethanols. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 2946-2961.
- [105] R. Albert, C. Ehrhardt, P. Etmayer, K. Hinterding, K. Högenauer, P. Nussbaumer, Aminopropanol derivatives as sphingosine-1-phosphate receptor modulators. *WO2004096757* **2004**.
- [106] Y. Kohno, N. Ando, K. Kuriyama, S. Iwanami, S. Kudou, Diaryl sulfide derivatives, salt thereof and immunosuppressive agents using the same. *WO2003029205* **2003**.
- [107] C. Ehrhardt, K. Hinterding, Amino-propanol derivatives. *WO2004110979* **2004**.
- [108] S. Pan, N. Gray, Y. Mi, W. Gao, Y. Fan, S. Lefebvre, Novel, bicyclic compounds and Compositions. *WO2004071442* **2004**.
- [109] M. Kiuchi, M. Nakamura, M. Hamada, K. Sugahara, 2-Aminobutanol compounds and use thereof for medical purposes. *WO2007126042* **2007**.
- [110] T. Nishi, S. Miyazaki, T. Takemoto, K. Suzuki, Y. Iio, K. Nakajima, T. Ohnuki, Y. Kawase, F. Nara, S. Inaba, T. Izumi, H. Yuita, K. Oshima, H. Doi, R. Inoue, W. Tomisato, T. Kagari, T. Shimozato, Discovery of CS-0777: A Potent, Selective, and Orally Active S1P 1 Agonist. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *2*, 368-372.
- [111] A. K. Saha, M. J. Kavarana, G. Evindar, A. L. Satz, B. Morgan, Methods and compositions for modulating sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor activity. *WO2006020951* **2006**.
- [112] R. Albert, N. G. Cooke, I. Lewis, S. Weiler, F. Zecri, Oxadiazole derivatives with anti-inflammatory and immunosuppressive properties. *WO2008037476* **2008**.
- [113] T. Nishi, T. Takemoto, T. Shimozato, F. Nara, Amino alcohol derivatives. . *WO2002006268* **2002**.
- [114] K. R. Lynch, T. L. Macdonald, Compounds active in sphingosine-1-phosphate signalling. *WO2004010949* **2004**.
- [115] K. R. Lynch, T. L. Macdonald, Bicyclic sphingosine 1-phosphate analogs. *WO2007092638* **2007**.
- [116] K. R. Lynch, T. L. Macdonald, Sphingosine 1-phosphate agonists comprising cycloalkanes and 5-membered heterocycles substituted by amino and phenyl groups. *WO2006088944* **2006**.

- [117] S. Crosignani, A. Bombrun, D. Covini, M. Maio, D. Marin, A. Quattropani, D. Swinnen, D. Simpson, W. Sauer, B. Françon, T. Martin, Y. Cambet, A. Nichols, I. Martinou, F. Burgat-Charvillon, D. Rivron, C. Donini, O. Schott, V. Eligert, L. Novo-Perez, P.-A. Vitte, J.-F. Arrighi, Discovery of a novel series of potent S1P₁ agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 1516-1519.
- [118] J. J. Clemens, M. D. Davis, K. R. Lynch, i. L. Macdonald, Synthesis of benzimidazole based analogues of sphingosine-1-phosphate: discovery of potent, subtype-selective S1P 4 receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 4903-4906.
- [119] V. J. Cee, M. J. Frohn, B. A. Lanman, A. B. Reed, K. K. C. Sham, S1P₁ receptor agonists and use thereof. WO2009154775 **2009**.
- [120] L. Yan, R. Budhu, P. Huo, C. L. Lynch, J. J. Hale, S. G. Mills, R. Hajdu, C. A. Keohane, M. J. Rosenbach, J. A. Milligan, G.-J. Shei, G. Chrebet, J. Bergstrom, D. Card, S. M. Mandala, 2-Aryl(pyrrolidin-4-yl)acetic acids are potent agonists of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 3564-3568.
- [121] V. J. Colandrea, I. E. Legiec, P. Huo, L. Yan, J. J. Hale, S. G. Mills, J. Bergstrom, D. Card, G. Chebret, R. Hajdu, C. A. Keohane, J. A. Milligan, M. J. Rosenbach, G.-J. Shei, S. M. Mandala, 2,5-Disubstituted pyrrolidine carboxylates as potent, orally active sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 2905-2908.
- [122] M. Capet, N. Levoine, I. Berrebi-Bertrand, P. Poupardin, P. Robert, J.-C. Schwartz, J.-M. Lecomte, T. Rajamannar, R. K. Pal, B. Samanta, J. K. Jivani, B. M. Panchal, I. H. Bhatt, J. D. Aradhye, Novel dicarboxylic acid derivatives. WO2006043149 **2006**.
- [123] M. Capet, N. Levoine, I. Berrebi-Bertrand, P. Robert, J.-C. Schwartz, J. M. Lecomte, J. D. Aradhye, M. N. Pillai, R. M. Panchal, J. K. Jivani, B. Samanta, R. Thennati, Novel dicarboxylic acid derivatives as S1P1 receptor agonists. WO2008152149 **2006**.
- [124] A. D. Hobson, S. Fix-Stenzel, K. P. Cusack, E. C. Breinlinger, G. K. Ansell, R. H. Stoffel, Novel oxadiazole compounds. WO2008076356 **2008**.
- [125] W. Lu, S. Pan, T. H. Marsilje, W. Gao, N. S. Gray, Y. He, Y. Liu, Y. Mi, Y. Xie, Immunosuppressant compounds and compositions. WO2005082089 **2005**.
- [126] Y. Ohmori, T. Serizawa, K. Sugie, K. Tanaka, A. Matsumoto, Amino ACID Compound. WO2009131090 **2009**.
- [127] M. U. Miguel Guerrero, Subash Velaparathi, Marie-Therese Schaeffer, Steven J Brown, Melissa Crisp, Jill Ferguson, Peter Hodder, Hugh Rosen, Michael Oldstone, and Edward Roberts., Identification of a Novel Agonist of the Sphingosine 1-phosphate Receptor 4 (S1P4). *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]* **2010-**, Bethesda (MD), National Center for Biotechnology Information (US), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143556/>.
- [128] S. M. Cahalan, P. J. Gonzalez-Cabrera, G. Sarkisyan, N. Nguyen, M.-T. Schaeffer, L. Huang, A. Yeager, B. Clemons, F. Scott, H. Rosen, Actions of a picomolar short-acting S1P₁ agonist in S1P₁-eGFP knock-in mice. *Nature Chemical Biology* **2011**, *7*, 254-256.
- [129] S. Pan, N. S. Gray, Y. Fan, W. Gao, Immunosuppressant compounds and compositions. WO2004133330 **2004**.
- [130] E. H. Demont, J. P. Heer, T. D. Heightman, D. N. Hurst, C. N. Johnson, J. Skidmore, I. D. Wall, J. Withering, Oxadiazole derivatives active on sphingosine-1-phosphate (S1P). WO2009080725 **2009**.
- [131] N. Machinaga, T. Yoshino, J. Chiba, J. Watanabe, T. Suzuki, Heteroarylamine lower carboxylic acid derivative. WO2007129745 **2007**.
- [132] S. Pan, Y. Mi, C. Pally, C. Beerli, A. Chen, D. Guerini, K. Hinterding, B. Nuesslein-Hildesheim, T. Tuntland, S. Lefebvre, Y. Liu, W. Gao, A. Chu, V. Brinkmann, C. Bruns, M. Streiff, C. Cannet, N. Cooke, N. Gray, A Monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model. *Chemical & Biology* **2006**, *13*, 1227-1234.
- [133] S. Pan, N. S. Gray, W. Gao, Y. Mi, Y. Fan, X. Wang, T. Tuntland, J. Che, S. Lefebvre, Y. Chen, A. Chu, K. Hinterding, A. Gardin, P. End, P. Heining, C. Bruns, N. G. Cooke, B. Nuesslein-Hildesheim, Discovery of BAF312 (Siponimod), a Potent and Selective S1P Receptor Modulator. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 333-337.
- [134] E. Roberts, H. Rosen, S. Brown, M. Morales, X. Peng, R. Poddutoori, Novel modulators of sphingosine phosphate receptors. WO2009151529 **2009**.
- [135] G. A. Doherty, J. J. Hale, I. E. Legiec, C. L. Lynch, L. M. Toth, 3,5-Aryl, heteroaryl or cycloalkyl substituted 1,2,4-oxadiazoles as S1P receptor agonists. WO2005032465 **2005**.

- [136] P. J. Gonzalez-Cabrera, E. Jo, M. G. Sanna, S. Brown, N. Leaf, D. Marsolais, M. T. Schaeffer, J. Chapman, M. Cameron, M. Guerrero, E. Roberts, H. Rosen, Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions. *Molecular Pharmacology* **2008**, *75*, 1308-1318.
- [137] R. Albert, N. G. Cooke, F. Zécéri, I. Lewis, Phenyl-oxetanyl-derivatives. WO2009068682 **2009**.
- [138] M. Bolli, D. Lehmann, B. Mathys, C. Mueller, O. Nayler, B. Steiner, J. Velker, Phenyl derivatives and their use as immunomodulators. WO2008035239 **2008**.
- [139] F. J. Zécéri, R. Albert, G. Landrum, K. Hinterding, N. G. Cooke, D. Guerini, M. Streiff, C. Bruns, B. Nuesslein-Hildesheim, J. L. Abad, Pyrazole derived from (+)-3-carene; a novel potent, selective scaffold for sphingosine-1-phosphate (S1P 1) receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 35-37.
- [140] E. C. Breinlinger, K. P. Cusack, A. D. Hobson, B. Li, T. D. Gordon, R. H. Stoffel, G. A. Wallace, P. Gronsgaard, L. Wang, L. Wang, Novel therapeutic compounds. WO2009011850 **2009**.
- [141] M. Oldstone, P. Hodder, M. Crisp, E. Roberts, M. Guerrero, M. Urbano, S. Velaparthi, J. Zhao, H. Rosen, M. Schaeffer, S. Brown, J. Ferguson, Probe Development Efforts to Identify Novel Antagonists of the Sphingosine 1-phosphate Receptor 4 (S1P4) *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]* **2010**, Bethesda (MD), National Center for Biotechnology Information (US), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK51967/>.
- [142] M. Bolli, D. Lehmann, B. Mathys, C. Mueller, J. Velker, Novel thiophene derivatives. WO2006137019 **2006**.
- [143] R. Baenteli, N. G. Cooke, F. Zécéri, A. B. Smith, Chromone S1P1 receptor agonist. WO2008092930 **2008**.
- [144] A. Bombrun, M. Schwarz, S. Crosignani, D. Covini, D. Marin, 6-Amino-pyrimidine-4-carboxamide derivatives and related compounds which bind to the sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor for the treatment of multiple sclerosis. WO2009019167 **2009**.
- [145] H. Satsu, M.-T. Schaeffer, M. Guerrero, A. Saldana, C. Eberhart, P. Hodder, C. Cayanan, S. Schürer, B. Bhhatarai, E. Roberts, H. Rosen, S. J. Brown, A sphingosine 1-phosphate receptor 2 selective allosteric agonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 5373–5382.
- [146] Probe report for S1P2 agonist (ML031). *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]* **2007**, The Scripps Research Institute
The Molecular Libraries Screening Centers Network, https://mli.nih.gov/mli/?dl_id=720.
- [147] M. M. Osada, Y. Y. Yatomi, T. T. Ohmori, H. H. Ikeda, Y. Y. Ozaki, Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *299*, 483.
- [148] M. Guerrero, M. Urbano, J. Zhao, M. Crisp, P. Chase, P. Hodder, M.-T. Schaeffer, S. Brown, H. Rosen, E. Roberts, Discovery, design and synthesis of novel potent and selective sphingosine-1-phosphate 4 receptor (S1P(4)-R) agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 537-542.
- [149] M. Guerrero, R. Poddutoori, M. Urbano, X. Peng, T. P. Spicer, P. S. Chase, P. S. Hodder, Marie-Therese Schaeffer, S. Brown, H. Rosen, E. Roberts, Discovery, design and synthesis of a selective S1P 3 receptor allosteric agonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.075>.
- [150] A. Murakami, H. Takasugi, S. Ohnuma, Y. Koide, A. Sakurai, S. Takeda, T. Hasegawa, J. Sasamori, T. Konno, K. Hayashi, Y. Watanabe, K. Mori, Y. Sato, A. Takahashi, N. Mochizuki, N. Takakura, Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. *Molecular Pharmacology* **2010**, *77*, 704-713.
- [151] P. Brossard, H. Derendorf, J. Xu, H. Maatouk, A. Halabi, J. Dingemans, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ponesimod, a Selective S1P1 Receptor Modulator, in the First-in-Human Study. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2013**, *76*, 888-896.
- [152] M. Guerrero, M. Urbano, S. Velaparthi, J. Zhao, M.-T. Schaeffer, S. Brown, H. Rosen, E. Roberts, Discovery, design and synthesis of the first reported potent and selective sphingosine-1-phosphate 4 (S1P4) receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 3632-3636.
- [153] S. C. Schürer, S. J. Brown, P. J. Gonzalez-Cabrera, M.-T. Schaeffer, J. Chapman, E. Jo, P. Chase, T. Spicer, P. Hodder, H. Rosen, Ligand-binding pocket shape differences between sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors S1P 1 and S1P 3 determine efficiency of chemical probe identification by ultrahigh-throughput screening. *ACS Chemical Biology* **2008**, *3*, 486-498.

- [154] Y. Fujii, Y. Ueda, H. Ohtake, N. Ono, T. Takayama, K. Nakazawa, Y. Igarashi, R. Goitsuka, Blocking S1P interaction with S1P1 receptor by a novel competitive S1P₁-selective antagonist inhibits angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *419*, 754-760.
- [155] H. Ikeda, H. Satoh, M. Yanase, Y. Inoue, T. Tomiya, M. Arai, K. Teijima, K. Nagashima, H. Maekawa, N. Yahagi, Y. Yatomi, S. Sakurada, Y. Takuwa, I. Ogata, S. Kimura, K. Fujiwara, Antiproliferative Property of Sphingosine 1-Phosphate in Rat Hepatocytes Involves Activation of Rho Via Edg-5. *Gastroenterology* **2003**, *124*.
- [156] T. Komiya, K. Sato, H. Shioya, Y. Inagaki, H. Hagiya, R. Kozaki, M. Imai, Y. Takada, T. Maeda, H. Kurata, M. Kurono, R. Suzuki, K. Otsuki, H. Habashita, S. Nakade, Efficacy and immunomodulatory actions of ONO-4641, a novel selective agonist for sphingosine 1-phosphate receptors 1 and 5, in preclinical models of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology* **2013**, *171*, 54-62.
- [157] Q. Deng, J. A. Clemas, G. Chrebet, P. Fischer, J. J. Hale, Z. Li, S. G. Mills, J. Bergstrom, S. Mandala, R. Mosley, S. A. Parent, Identification of Leu276 of the S1P1 Receptor and Phe263 of the S1P3 Receptor in Interaction with Receptor Specific Agonists by Molecular Modeling, Site-Directed Mutagenesis, and Affinity Studies. *Molecular Pharmacology* **2007**, *71*, 724-735.
- [158] J. K. Willmann, N. v. Bruggen, L. M. Dinkelborg, S. S. Gambhir, Molecular imaging in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7*, 591-607.
- [159] M. Rudin, R. Weissleder, Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 123-131.
- [160] V. Ntziachristos, Fluorescence Molecular Imaging. *Annual Review of Biochemistry* **2006**, *8*, 1-33.
- [161] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science* **2006**, *312*, 217-224.
- [162] P. Lang, K. Yeow, A. Nichols, A. Scheer, Cellular imaging in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5*.
- [163] P. Watson, A. T. Jones, D. J. Stephens, Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *43*, 43-61.
- [164] C. L. Hartwig, E. M. W. Lauterwasser, S. S. Mahajan, J. M. Hoke, R. A. Cooper, A. R. Renslo, Investigating the Antimalarial Action of 1,2,4-Trioxolanes with Fluorescent Chemical Probes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 8207-8213.
- [165] M. S. T. Gonçalves, Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 190-212.
- [166] M. Leopoldo, E. Lacivita, F. Berardi, R. Perrone, Developments in fluorescent probes for receptor research. *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 706-712.
- [167] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure, Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nature Cell Biology* **2003**, *S1-S7*.
- [168] R. B. Sekar, A. J. Periasamy, Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *Journal of Cell Biology* **2003**, *160*, 629-633.
- [169] T. Wilson, J. W. Hastings, Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1998**, *14*, 197-230.
- [170] S. T. M. Allard, K. Kopish, Luciferase Reporter Assays: Powerful, Adaptable Tools For Cell Biology Research *Cell Notes* **2008**, *21*, 23-26.
- [171] ThermoScientific, <http://www.piercenet.com/method/luciferase-reporters>, **Zugriff am 10.03.2014**.
- [172] A. Wissner, H. L. Fraser, C. L. Ingalls, R. G. Dushin, M. B. Floyd, K. Cheung, T. Nittoli, M. R. Ravi, X. Tan, F. Loganzo, Dual irreversible kinase inhibitors: Quinazoline-based inhibitors incorporating two independent reactive centers with each targeting different cysteine residues in the kinase domains of EGFR and VEGFR-2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 3635-3648.
- [173] H.-R. Tsou, E. G. Overbeek-Klumpers, W. A. Hallett, M. F. Reich, M. B. Floyd, B. D. Johnson, R. S. Michalak, R. Nilakantan, C. Discifani, J. Golas, Sridhar K. Rabindran, R. Shen, X. Shi, Y.-F. Wang, J. Upešlaciš, A. Wissner, Optimization of 6,7-Disubstituted-4-(arylamino)quinoline-3-carbonitriles as Orally Active, Irreversible Inhibitors of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Kinase Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 1107-1131.
- [174] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, The resurgence of covalent drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **2011**, *10*, 307-317.
- [175] M. Goeldner, F. Kotzyba-Hibert, I. Kapfer, Recent Trends in Photoaffinity Labeling *Angewandte Chemie, International Edition* **1995**, *34*, 1296-1312.
- [176] A. Sinz, Isotope-Labeled Photoaffinity Reagents and Mass Spectrometry To Identify Protein-Ligand Interactions. *Angewandte Chemie, International Edition* **2007**, *46*, 660-662.

- [177] S. A. Fleming, Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12419-12520.
- [178] D. A. Jeffery, A. Baruch, M. Bogoy, *Cancer Drug Discovery and Development: The Oncogenomics Handbook*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2005**.
- [179] J. A. Blair, D. Rauh, C. Kung, C.-H. Yun, Q.-W. Fan, H. Rode, C. Zhang, M. J. Eck, W. A. Weiss, K. M. Shokat, Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics. *ACS Chemical Biology* **2007**, *3*, 229-238.
- [180] H. Kiefer, J. Lindstrom, E. S. Lennox, S. J. Singer, Photo-affinity labeling of specific acetylcholine-binding sites on membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1970**, *4*, 1688-1694.
- [181] A. E. Ruoho, H. Kiefer, P. E. Roeder, S. J. Singert, The Mechanism of Photoaffinity Labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1973**, *70*, 2567-2571.
- [182] K. Levitsky, M. D. Boersma, C. J. Ciolli, P. J. Belshaw, Exo-Mechanism Proximity-Accelerated Alkylations: Investigations of Linkers, Electrophiles and Surface Mutations in Engineered Cyclophilin-Cyclosporin Systems. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 890-899.
- [183] B. Foucaud, R. Perret, T. Grutter, M. Goeldner, Cystein mutants as chemical sensors for ligand-receptor interactions. *TRENDS in Pharmacological Sciences* **2001**, *22*, 170-173.
- [184] S. S. Gallagher, J. E. Sable, M. P. Sheetz, V. W. Cornish, An *In Vivo* Covalent TMP-Tag Based on Proximity-Induced Reactivity. *ACS Chemical Biology* **2009**, *4*, 547-556.
- [185] L. Peng, Y. Xia, Photoactivatable Lipid Probes for Studying Biomembranes by Photoaffinity Labeling. *Chemical Reviews* **2013**, ASAP, dx.doi.org/10.1021/cr300419p.
- [186] G. Dormán, G. D. Prestwich, Using photolabile ligands in drug discovery and development. *TRENDS in Biotechnology* **2000**, *18*, 64-77.
- [187] G. Dormán, G. D. Prestwich, Benzophenone Photophore in Biochemistry. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
- [188] C. Charlier, J.-P. Hénichart, F. Durant, J. Wouters, Structural Insights into Human 5-Lipoxygenase Inhibition: Combined Ligand-Based and Target-Based Approach. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 186-195.
- [189] O. Rådmark, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *Journal of Lipid Research* **2009**, April Supplement, S40-S45.
- [190] O. Radmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *TRENDS in Biochemical Sciences* **2007**, *32*, 332-341.
- [191] O. Radmark, B. Samuelsson, Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *338*, 102-110.
- [192] A. W. Ford-Hutchinson, M. Gresser, R. N. Young, 5-LIPOXYGENASE. *Annual Review of Biochemistry* **1994**, *63*, 383-417
- [193] O. Rådmark, Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* **2002**, *68-69*, 211-234.
- [194] N. C. Gilbert, S. G. Bartlett, M. T. Waight, D. B. Neau, W. E. Boeglin, A. R. Brash, M. E. Newcomer, The Structure of Human 5-Lipoxygenase. *Science* **2011**, *331*, 217-219.
- [195] A. D. Ferguson, B. M. McKeever, S. Xu, D. Wisniewski, D. K. Miller, T.-T. Yamin, R. H. Spencer, L. Chu, F. Ujjainwalla, B. R. Cunningham, J. F. Evans, J. W. Becker, Crystal Structure of Inhibitor-Bound Human 5-Lipoxygenase – Activating Protein. *Science* **2007**, *317*, 510-512.
- [196] R. A. F. Dixon, R. E. Diehl, E. Opas, E. Rands, P. J. Vickers, J. F. Evans, J. W. Gillard, D. K. Miller, Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* **1990**, *343*, 282-284.
- [197] O. Werz, D. Steinhilber, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *112*, 701-718.
- [198] Y. Iizuka, T. Yokomizo, K. Terawaki, M. Komine, K. Tamaki, T. Shimizu, Characterization of a Mouse Second Leukotriene B4 Receptor, mBLT2. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 24816-24823.
- [199] D. PoECKel, C. D. Funk, The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* **2010**, *86*, 243-253.
- [200] M. Peters-Golden, W. R. Henderson, Mechanisms of Disease Leukotrienes. *The New England Journal of Medicine* **2007**, *357*, 1841-1854.
- [201] M. Nakamura, T. Shimizu, Leukotriene Receptors. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 6231-6298.
- [202] C. Corrigan, K. Mallett, S. Ying, D. Roberts, A. Parikh, G. Scadding, T. Lee, Expression of the cysteinyl leukotriene receptors cysLT1 and cysLT2 in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant chronic rhinosinusitis *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, *115*, 316-322.

- [203] A. Maekawa, Y. Kanaoka, B. K. Lam, K. F. Austen, Identification in mice of two isoforms of the cysteinyl leukotriene 1 receptor that result from alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 2256-2261.
- [204] C. N. Serhan, Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **2005**, *73*, 141-162.
- [205] F. Tsuji, Y. Miyake, H. Enomoto, M. Horiuchi, S. Mita, Effects of SA6541, a leukotriene A4 hydrolase inhibitor, and indomethacin on carrageenan-induced murine dermatitis. *European Journal of Pharmacology* **1998**, *346*, 81-85.
- [206] J. Kachur, L. Askonas, D. Villani-Price, N. Ghoreishi-Haack, S. Won-Kim, C. Liang, M. Russell, S. WG, Pharmacological characterization of SC-57461A (3-[methyl[3-[4-(phenylmethyl)phenoxy]propyl]amino]propanoic acid HCl), a potent and selective inhibitor of leukotriene A(4) hydrolase II: in vivo studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, *300*, 583-587.
- [207] Y. M. Shim, M. Paige, *Leukotriene A 4 Hydrolase – An Evolving Therapeutic Target*, <http://www.intechopen.com/books/inflammatory-diseases-immunopathology-clinical-and-pharmacological-bases/updates-in-leukotriene-a4-hydrolase-evolving-pharmacologic-target>, **2012**.
- [208] J. H. Hutchinson, D. Riendeau, C. Brideau, C. Chan, J.-P. Falguyret, J. Guay, T. R. Jones, C. Lepine, D. Macdonald, Thiopyrano[2,3,4-cd]indoles as 5-Lipoxygenase Inhibitors: Synthesis, Biological Profile, and Resolution of 2-[2-[1-(4-Chlorobenzyl)-4-methyl-6-[(5-phenylpyridin-2-yl)methoxy]-4,5-dihydro-1H-thiopyrano[2,3,4-cd]indol-2-yl]ethoxy]butanoic Acid. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 1153-1164.
- [209] D. M. Molina, A. Wetterholm, A. Kohl, A. A. McCarthy, D. Niegowski, E. Ohlson, T. Hammarberg, S. Eshaghi, J. Z. Haeggström, P. Nordlund, Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase. *Nature* **2007**, *448*, 613-616.
- [210] H. Ago, N. Okimoto, Y. Kanaoka, G. Morimoto, Y. Ukita, H. Saino, M. Taiji, M. Miyano, A leukotriene C 4 synthase inhibitor with the backbone of 5-(5-methylene-4-oxo-4,5-dihydrothiazol-2-ylamino)isophthalic acid. *Journal of Biochemistry* **2013**, *153*, 421-429.
- [211] H. J. Showell, M. J. Conklyn, R. Alpert, G. P. Hingorani, K. F. Wright, M. A. Smith, E. Stam, E. D. Salter, D. N. Scampoli, S. Meltzer, L. A. Reiter, K. Koch, A. D. Piscopio, S. R. Cortina, A. Lopez-Anaya, E. R. Pettipher, A. J. Milici, R. J. Griffiths, The Preclinical Pharmacological Profile of the Potent and Selective Leukotriene B4 Antagonist CP-195543. *Pharmacology And Experimental Therapeutics* **1998**, *285*, 946-954.
- [212] A. Hicks, R. G. Jr, G. Cavallo, S. A. Tannu, J. D. Ventre, D. Lavelle, J. M. Lora, J. Satjawatcharaphong, M. Brovarney, K. Dabbagh, N. S. Tare, H. Oh, M. Lamb, A. Sidduri, R. Dominique, Q. Qiao, J. P. Lou, P. Gillespie, N. Fotouhi, A. Kowalczyk, G. Kurylko, R. Hamid, M. B. Wright, A. Pamidimukkala, T. Egan, U. Gubler, A. F. Hoffman, X. Wei, Y. L. Li, J. O'Neil, R. Marciano, K. Pozzani, T. Molinaro, J. Santiago, L. Singer, M. Hargaden, D. Moore, A. R. Catala, L. C. F. Chao, J. Benson, T. March, R. Venkat, H. Mancebo, L. M. Renzetti, Effects of LTB4 receptor antagonism on pulmonary inflammation in rodents and non-human primates. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* **2010**, *92*, 33-43.
- [213] F. Díaz-González, R. H. Alten, W. G. Bensen, J.P.Brown, J. T. Sibley, M. Dougados, S. Bombardieri, P. Durez, P. Ortiz, G. de-Miquel, A. Staab, R. Sigmund, L. Salin, S. Leledy, S. H. Polmar, Clinical trial of a leukotriene B4 receptor antagonist, BIIL 284, in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* **2007**, *66*, 628-632.
- [214] F. Ferrari, L. Mennuni, G. Caselli, T. Zanelli, F. Makovec, Pharmacological profile of CR3465, a new leukotriene CysLT1 receptor antagonist with broad anti-inflammatory activity. *European Journal of Pharmacology* **2004**, *504*, 223-233.
- [215] S. Savari, M. Liu, Y. Zhang, W. Sime, A. Sjölander, CysLT1 R Antagonists Inhibit Tumor Growth in a Xenograft Model of Colon Cancer. *PLOS one* **2013**, *8*, e73466.
- [216] N. C. Ni, L. Dong Yan, L. Ballantyne, A. Barajas-Espinosa, T. S. Amand, D. A. Pratt, C. D. Funk, A Selective Cysteinyl Leukotriene Receptor 2 Antagonist Blocks Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury and Vascular Permeability in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2011**, *339*, 768-778.

- [217] J. Gillard, A. W. Ford-Hutchinson, C. Chan, S. Charleson, D. Denis, A. Foster, R. Fortin, S. Leger, C. S. McFarlane, H. Morton, H. Piechuta, D. Riendeau, C. A. Rouzer, J. Rokach, R. Young, D. E. MacIntyre, L. Peterson, T. Bach, G. Eiermann, S. Hoppl, J. Humes, L. Hupe, S. Luell, J. Metzger, R. Meurer, D. K. Miller, E. Opas, S. Pacholok, L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-*t*-butylthio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **1990**, *67*, 456-464.
- [218] C. Brideau, C. S. Chan, et al., Pharmacology of MK-0591 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-(*t*-butylthio)-5-(quinolin-2-yl-methoxy)-indol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a potent, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **1992**, *70*, 799-807.
- [219] P. Prasit, M. Belley, C. Brideau, C. Chan, S. Charleson, J. F. Evans, R. Fortin, A. W. Ford-Hutchinson, J. W. Gillard, J. Guay, J. H. Hutchinson, S. Léger, D. Riendeau, R. N. Young, R. Zamboni, A new class of leukotriene biosynthesis inhibitors: The discovery of MK0591. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, *2*, 1395-1398.
- [220] J. H. Hutchinson, P. Prasit, L. Y. Choo, D. Riendeau, S. Charleson, J. F. Evans, H. Piechutan, R. G. Ball, Development Of L-689,065 - The Prototype Of A New Class Of Potent 5-lipoxygenase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, *2*, 1699-1702.
- [221] D. S. Lorrain, G. Bain, L. D. Correa, C. Chapman, A. R. Broadhead, A. M. Santini, P. Prodanovich, J. V. Darlington, J. H. Hutchinson, C. King, C. Lee, C. Baccei, Y. Li, J. M. Arruda, J. F. Evans, Pharmacological Characterization of 3-[3-*tert*-Butylsulfanyl-1-[4-(6-methoxy-pyridin-3-yl)-benzyl]-5-(pyridin-2-ylmethoxy)-1H-indol-2-yl]-2,2-dimethyl-propionic Acid (AM103), a Novel Selective 5-Lipoxygenase-Activating Protein Inhibitor That Reduces Acute and Chronic Inflammation *Pharmacology And Experimental Therapeutics* **2009**, *331*, 1042-1050.
- [222] B. Hofmann, D. Steinhilber, 5-Lipoxygenase inhibitors: a review of recent patents (2010 - 2012). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2013**, *23*, 895-909.
- [223] D. Steinhilber, B. Hofmann, Recent Advances in the Search for Novel 5-Lipoxygenase Inhibitors. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2013**, Doi: 10.1111/bcpt.12114.
- [224] C. D. W. Brooks, A. O. Stewart, T. Kolasa, A. Basha, P. Bhatia, J. D. Ratajczyk, R. A. Craig, D. Gunn, R. R. Harris, J. B. Bouska, P. E. Malo, R. L. Bell, G. W. Carter, Design of inhibitors of leukotriene biosynthesis and their therapeutic potential *Pure and Applied Chemistry* **1998**, *70*, 271-274.
- [225] B. Hofmann, S. Barzen, C. B. Rödl, A. Kiehl, J. Borig, A. Zivkovic, H. Stark, G. Schneider, D. Steinhilber, A Class of 5-Benzylidene-2-phenylthiazolinones with High Potency as Direct 5-Lipoxygenase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 1943-1947.
- [226] D. Schomburg, I. Schomburg, A. Chang, *Springer Handbook of Enzymes: Class 1 Oxidoreductases X, Vol. 25*, Springer, **2006**.
- [227] V. E. Steele, C. A. Holmes, E. T. Hawk, L. Kopelovich, R. A. Lubet, J. A. Crowell, C. C. Sigman, G. J. Kelloff, Lipoxygenase Inhibitors as Potential Cancer Chemopreventives. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **1999**, *8*, 467-483.
- [228] P. Belanger, A. Maycock, Y. Guindon, T. Bach, A. L. Dollob, C. Dufresne, A. W. Ford-Hutchinson, P. H. Gale, S. Hopple, C. K. Lau, L. G. Letts, S. Luell, C. S. McFarlane, E. MacIntyre, R. Meurer, D. K. Miller, H. Piechuta, D. Riendeau, J. Rokach, C. Rouzer, J. Scheiget, L-656,224 (7-chloro-2-[(4-methoxyphenyl)methyl]-3-methyl-5-propyl-4-benzofuranol): a novel, selective, orally active 5-lipoxygenase inhibitor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **1987**, *65*, 2441-2448.
- [229] K. Mariën, M. Morren, H. Degreef, P. D. Doncker, R. P. Rooman, G. Cauwenbergh, Treatment of Hyperkeratotic Skin Diseases With R 68151, a Topical 5-Lipoxygenase Inhibitor: Four Case Reports. *JAMA Dermatology* **1992**, *128*, 993-994.
- [230] Y. Tohda, M. Muraki, A. Kawai, T. Iwanaga, H. Kubo, M. Fukuoka, S. Nakajima, Inhibitory effect of TMK-688 on late asthmatic responses as well as T-cell and eosinophilic infiltration in guinea pigs with asthmatic reactions. *International Journal of Immunopharmacology* **2000**, *22*, 123-130.
- [231] P. Arenberger, A. Raap, B. Armah, L. Kemény, T. Ruzicka, The Lipoxygenase Inhibitor 2-Phenylmethyl-1-Naphthol (DuP 654) Is a 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Receptor Antagonist in the Human Epidermal Cell Line SCL-II. *Skin Pharmacology and Physiology* **1993**, *6*, 148-151.
- [232] P. Bruneau, C. Delvare, M. P. Edwards, R. M. McMillant, Indazolinones, a New Series of Redox-Active 5-Lipoxygenase Inhibitors with Built-In Selectivity and Oral Activity *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *34*, 1028-1036.

- [233] D. W. Brooks, D. H. Albert, R. D. Dyer, J. B. Bouska, P. Young, G. Rotert, J. M. M. W. Carter, 1-Phenyl-[2H]-tetrahydropyridazin-3-one, A-53612, A Selective Orally Active 5-lipoxygenase Inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, *2*, 1353-1356.
- [234] J. B. Summers, B. P. Gunn, J. G. Martin, H. Mazdiyasi, A. O. Stewart, P. R. Young, A. M. Goetze, J. B. Bouska, R. D. Dyer, Orally active hydroxamic acid inhibitors of leukotriene biosynthesis. *Journal of Medicinal Chemistry* **1988**, *31*, 3-5.
- [235] R. L. Bell, J. B. Bouska, P. E. Malo, C. Lanni, R. R. Harris, E. A. Otis, A. O. Stewart, D. W. Brooks, G. W. Carter, Optimization of the Potency and Duration of Action of N-Hydroxyurea 5-Lipoxygenase Inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1994**, *272*, 724-732.
- [236] Y. Ducharme, C. Brideau, D. Dub, C.-C. Chan, J.-P. Falguyret, J. W. Gillard, J. Guay, J. H. Hutchinson, C. S. McFarlane, D. Riendeau, J. Scheigetz, Y. Girard, Naphthalenic Lignan Lactones as Selective, Nonredox 5-Lipoxygenase Inhibitors. Synthesis and Biological Activity of (Methoxyalkyl)thiazole and Methoxytetrahydropyran Hybrids *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *37*, 512-518.
- [237] T. G. C. Bird, P. Bruneau, G. C. Crawley, J. M. P. Edwards, S. J. Foster, J.-M. Girodeau, J. F. Kingston, R. M. McMillan, (Methoxyalkyl)thiazoles: A New Series of Potent, Selective, and Orally Active 5-Lipoxygenase Inhibitors Displaying High Enantioselectivity *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *34*, 2176-2186.
- [238] L. Fischer, D. Szellas, O. Radmark, D. Steinhilber, O. Werz, Phosphorylation- and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitor. *The FASEB Journal* **2003**, *17*, 949-951.
- [239] E. J. Kusner, C. K. Buckner, D. M. Dea, C. J. DeHaas, R. L. Marks, R. D. Krell, The 5-Lipoxygenase inhibitors ZD2138 and ZM230487 are potent and selective inhibitors of several antigen-induced guinea-pig pulmonary responses *European Journal of Pharmacology* **1994**, *257*, 285-292.
- [240] J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, M. Hardy, G. D. Anderson, D. Dufield, L. Cortes-Burgos, R. A. Pufahl, M. Graneto, Pharmacology of PF-4191834, a Novel, Selective Non-Redox 5-Lipoxygenase Inhibitor Effective in Inflammation and Pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2010**, *334*, 294-301.
- [241] P. Hamel, D. Riendeau, C. Brideau, C.-C. Chan, S. Desmarais, D. Delorme, D. Dubé, Y. Ducharme, D. Ethier, E. Grimm, J.-P. Falguyret, J. Guay, T. R. Jones, E. Kwong, M. McAuliffe, C. S. McFarlane, H. Piechuta, M. Roumi, P. Tagari, R. N. Young, Y. Girard, Substituted (Pyridylmethoxy)naphthalenes as Potent and Orally Active 5-Lipoxygenase Inhibitors: Synthesis, Biological Profile, and Pharmacokinetics of L-739,010. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40*, 2866-2875.
- [242] Y. Ducharme, M. Blouin, C. Brideau, A. Châteauneuf, Y. Gareau, E. L. Grimm, Hélène Juteau, S. Laliberté, B. MacKay, F. Massé, M. Ouellet, M. Salem, A. Styhler, R. W. Friesen, The Discovery of Setileuton, a Potent and Selective 5-Lipoxygenase Inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *1*, 170-174.
- [243] B. Hofmann, L. Franke, E. Proschak, Y. Tanrikulu, P. Schneider, D. Steinhilber, G. Schneider, Scaffold-Hopping Cascade Yields Potent Inhibitors of 5-Lipoxygenase. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1535-1538.
- [244] T. J. Maier, L. Tausch, M. Hoernig, O. Coste, R. Schmidt, C. Angioni, J. Metzner, S. Groesch, C. Pergola, D. Steinhilber, O. Werz, G. Geisslinger, Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology* **2008**, *76*, 862-872.
- [245] L. Fischer, M. Hornig, C. Pergola, N. Meindl, L. Franke, Y. Tanrikulu, G. Dodt, G. Schneider, D. Steinhilber, O. Werz, The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *British Journal of Pharmacology* **2007**, *152*, 471-480.
- [246] P. C. Unangst, D. T. Connor, W. A. Cetenko, R. J. Sorenson, C. R. Kostlan, J. C. Sircar, C. D. Wright, D. J. Schrier, R. D. Dyer, Synthesis and Biological Evaluation of 5-[[3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]methylene]oxazoles, -thiazoles, and -imidazoles: Novel Dual 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase Inhibitors with Antiinflammatory Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 322-328.
- [247] A. A. Geronikaki, A. A. Lagunin, D. I. Hadjipavlou-Litina, P. T. Eleftheriou, D. A. Filimonov, V. V. Poroikov, I. Alam, A. K. Saxena, Computer-aided discovery of anti-inflammatory thiazolidinones with dual cyclooxygenase/lipoxygenase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 1609.
- [248] B. Hofmann, Identifizierung und Charakterisierung neuartiger 5-Lipoxygenase-Inhibitoren – in silico und in vitro. *Universität Frankfurt am Main* **2010**.

- [249] S. Barzen, C. B. Rödl, A. Lill, D. Steinhilber, H. Stark, B. Hofmann, Synthesis and biological evaluation of a class of 5-benzylidene-2-phenyl-thiazolinones as potent 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 3575–3583.
- [250] L. Peltason, J. Bajorath, SAR index: quantifying the nature of structure - activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 5571–5578.
- [251] M. Wawer, L. Peltason, N. Weskamp, A. Teckentrup, J. Bajorath, Structure - activity relationship anatomy by network-like similarity graphs and local structure - activity relationship indices. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 6075–6084.
- [252] D. Steinhilber, B. Hofmann, L. Franke, in WO2009027077, **2009**.
- [253] M. Ahmed, J. Myatt, D. Norton, D. A. Rivers, Indole-oxadiazole derivatives as S1P1 receptor agonists and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of diseases. WO2008074821 **2008**.
- [254] E. Martinborough, M. F. Boehm, A. R. Yeager, J. Tamiya, L. Huang, E. Brahmachary, M. Moorjani, G. A. Timony, J. L. Brooks, R. Peach, F. L. Scott, M. A. Hanson, Selective sphingosine 1 phosphate receptor modulators and methods of chiral synthesis of aryl(indanyl)-oxadiazoles and their use in the treatment of S1P1-associated diseases. WO2011060392 **2011**.
- [255] C. Montagne, A. Quattropiani, W. Sauer, A. Bombrun, Oxadiazole diaryl compounds. WO2009043890 **2009**.
- [256] E. Roberts, H. Rosen, S. Brown, M. Morales, X. Peng, R. Poddutoori, Preparation of disubstituted oxadiazoles as novel modulators of sphingosine phosphate receptors. WO2009151529 **2009**.
- [257] V. J. Colandrea, G. A. Doherty, J. J. Hale, C. L. Lynch, S. G. Mills, W. Neway, L. M. Toth, 3-(2-Amino-1-azacyclic)5-Aryl-1,2,4-Oxadiazoles as S1P1 Receptor Agonists. WO2004103279 **2004**.
- [258] L. Yan, P. Huo, J. J. Hale, S. G. Mills, R. Hajdu, C. A. Keohane, M. J. Rosenbach, J. A. Milligan, G.-J. Shei, G. Chrebet, J. Bergstrom, D. Card, S. M. Mandala, SAR studies of 3-arylpropionic acids as potent and selective agonists of sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) with enhanced pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 828–831.
- [259] L. Yan, P. Huo, G. Doherty, L. Toth, J. J. Hale, S. G. Mills, R. Hajdu, C. A. Keohane, M. J. Rosenbach, J. A. Milligan, G.-J. Shei, G. Chrebet, J. Bergstrom, D. Card, E. Quackenbush, A. Wickham, S. M. Mandala, Discovery of 3-arylpropionic acids as potent agonists of sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) with high selectivity against all other known S1P receptor subtypes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 3679–3683.
- [260] P. Vachal, L. M. Toth, J. J. Hale, L. Yan, S. G. Mills, G. L. Chrebet, C. A. Keohane, R. Hajdu, J. A. Milligan, M. J. Rosenbach, S. Mandala, Highly selective and potent agonists of sphingosine-1-phosphate 1 (S1P1) receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 3684–3687.
- [261] T. Yu, P. Zhang, Y. Zhao, H. Zhang, J. Meng, D. Fan, J. L. Abad, Synthesis, characterization and high-efficiency blue electroluminescence based on coumarin derivatives of 7-diethylamino-coumarin-3-carboxamide. *Organic Electronics* **2009**, *10*, 653–660.
- [262] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, **1994–1996**.
- [263] M. Amon, X. Ligneau, J.-C. Schwartz, H. Stark, Fluorescent non-imidazole histamine H₃ receptor ligands with nanomolar affinities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 1938–1940.
- [264] M. E. Vázquez, D. M. Rothman, B. Imperiali*, A new environment-sensitive fluorescent amino acid for Fmoc-based solid phase peptide synthesis. *Organic Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 1965–1966.
- [265] M. E. Vázquez, J. B. Blanco, B. Imperiali, Photophysics and Biological Applications of the Environment-Sensitive Fluorophore 6-N,N-Dimethylamino-2,3-naphthalimide. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 1300–1306.
- [266] B. D. Wagner, The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogeneous Inclusion Systems *Molecules* **2009**, *14*, 210–237.
- [267] A. Samanta, G. Saroja, B. Ramachandram, S. Saha, The Fluorescence Response of a Structurally Modified 4-Aminophthalimide Derivative Covalently Attached to a Fatty Acid in Homogeneous and Micellar Environments. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 2906–2911.
- [268] G. Saroja, T. Soujanya, B. Ramachandram, A. Samanta, 4-Aminophthalimide Derivatives as Environment-Sensitive Probes. *Journal of Fluorescence* **1998**, *8*, 405–410.
- [269] M. Sainlos, B. Imperiali, Tools for investigating peptide–protein interactions: peptide incorporation of environment-sensitive fluorophores via on-resin derivatization. *Nature Protocols* **2007**, *2*, 3201–3209.

- [270] M. Tomasch, J. S. Schwed, K. Kuczka, S. M. d. Santos, S. Harder, R. M. Nüsing, A. Paulke, H. Stark, Fluorescent Human EP3 Receptor Antagonists. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *3*, 774-779.
- [271] A. R. Katritzky, A. A. Shestopalov, K. Suzuki, A convenient synthesis of chiral 1,2,4-oxadiazoles from N-protected (α -aminoacyl)benzotriazoles. *ARKIVOC* **2005**, *vii*, 36-55.
- [272] D. Sinou, J. V. d. Anjos, S. J. d. Melo, R. M. Srivastava, Synthesis of Ethyl 4-O-[4-(1,2,4-Oxadiazol-5-yl)phenyl]- α -D-mannopyranosides. *Letters in Organic Chemistry* **2007**, *4*, 393-397.
- [273] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [274] M. Adib, M. Mahdavi, N. Mahmoodi, H. Pirelahi, H. R. Bijanzadeh, A Novel, One-Pot, Three-Component Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles under Microwave Irradiation and Solvent-Free Conditions. *Synlett* **2006**, *11*, 1765-1767.
- [275] P. G. Mattingly, Mono-Protected Diamines. $N\alpha$ -tert-Butoxycarbonyl α,ω -Alkanediamine Hydrochlorides from Amino alcohols. *Synthesis* **1990**, 366-368.
- [276] T. S. Scanlan, A. N. Snead, M. Miyakawa, E. S. Tan, Trace amine-associated receptor 1 (TAAR 1) is activated by amiodarone metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 5920-5922.
- [277] Y. Takeshi, F. Hiroshi, M. Tsutomu, M. Muneto, M. Toshiya, T. Masaomi, T. Yasuhiro, U. Klaus, Y. Noriyuki, Y. Nagahiro, in WO2004/72020, **2004**.
- [278] S. Bourrain, I. Collins, J. G. Neduvellil, M. Rowley, P. D. Leeson, S. Patel, S. Patel, F. Emms, R. Marwood, K. L. Chapman, A. E. Fletcher, G. A. Showell, Substituted pyrazoles as novel selective ligands for the human dopamine D4 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1998**, *10*, 1731-1743.
- [279] S. F. Malana, A. v. Marle, W. M. Menge, V. Zuliana, M. Hoffman, H. Timmerman, R. Leursb, Fluorescent ligands for the histamine H2 receptor: synthesis and preliminary characterization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 6495-6503.
- [280] K. S. Lam, A. Song, X. Wang, A convenient synthesis of coumarin-3-carboxylic acids via Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with ortho-hydroxyaryl aldehydes or ketones. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 1755-1758.
- [281] A. G. Corrêa, J. Alvim Jr., R. L. A. Dias, M. S. Castilho, G. Oliva, Preparation and evaluation of a coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. *J. Braz. Chem. Soc* **2005**, *16*, 763-773.
- [282] B. K. Höfelschweiger, The pyrylium dyes: A new class of biolabels. synthesis, spectroscopy, and application as labels and in general protein assay. *Universität Regensburg* **2005**.
- [283] B. K. Wetzl, S. M. Yarmoluk, D. B. Craig, O. S. Wolfbeis, Chameleon Labels for Staining and Quantifying Proteins. *Angewandte Chemie, International Edition* **2004**, *43*, 5400-5402.
- [284] G. N. Dorofeenko, E. P. Olekhovich, L. I. Laukhina, Synthesis of 2-methyl-3-carbethoxypyrylium salts by the condensation of ethoxymethyleneacetoacetic ester with ketones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1971**, *7*, 405-407.
- [285] M. Matsui, S. Kawamura, K. Shibata, H. Muramatsu, Synthesis and characterization of mono-, bis-, and trissubstituted pyridinium and pyrylium dyes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1992**, *65*, 71-74.
- [286] P. Onnertz, Ueber einige Umwandlungsproducte aus den beiden Nitroptalsäuren. *Chemische Berichte* **1901**, *34*, 3735-3747.
- [287] O. Miller, Ueber einige Phthalsäurederivate. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1881**, *208*, 223-248.
- [288] L. Yu, W. You, L. Wang, Q. Wang, Synthesis and Structure/Property Correlation of Fully Functionalized Photorefractive Polymers. *Macromolecules* **2002**, *35*, 4636-4645.
- [289] K.-D. Gundermann, M. Drawert, Konstitution und Chemilumineszenz, I. Sterische Resonanzhinderung bei alkylierten Amino-phthalhydraziden. *Chemische Berichte* **1962**, *95*, 2018-2026.
- [290] A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, R. D. Shah, Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 3849-3862.
- [291] N. Otake, Y. Haga, A. Naya, S. Mizutani, A. Kanatani, in EP1741703, **2007**.
- [292] A. B. Neef, C. Schultz, Selektive Fluoreszenzmarierung von Lipiden in lebenden Zellen. *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 1526-1529.

- [293] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [294] Q. Wang, K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. *Organic Letters* **2004**, *6*, 4603.
- [295] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 13-21.
- [296] C. Anderson, D. A. Freedman, M. Jennings, B. Gray, Dimethylplatinum (II) complexes with isocyanocoumarin ligands: the crystal structure of cis-dimethylbis-(7-diethylamino-3-isocyanocoumarin)platinum(II). *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, *690*, 168-176.
- [297] E. B. Bauer, F. Hampel, J. A. Gladysz, Alkyne Metatheses in Transition Metal Coordination Spheres: Convenient Tungsten- and Molybdenum-Catalyzed Syntheses of Novel Metallamacrocycles. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2004**, *346*, 812-822.
- [298] J. Dinges, D. H. Albert, L. D. Arnold, K. L. Ashworth, I. Akritopoulou-Zanze, P. F. Bousquet, J. J. Bouska, G. A. Cunha, S. K. Davidsen, G. J. Diaz, S. W. Djuric, A. F. Gasielki, G. A. Gintant, V. J. Gracias, C. M. Harris, K. A. Houseman, C. W. Hutchins, E. F. Johnson, H. Li, P. A. Marcotte, R. L. Martin, M. R. Michaelides, M. Nyein, T. J. Sowin, Z. Su, P. H. Tapang, Z. Xia, H. Q. Zhang, 1,4-Dihydroindeno[1,2-c]pyrazoles with Acetylenic Side Chains as Novel and Potent Multitargeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors with Low Affinity for the hERG Ion Channel. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 2011-2029.
- [299] A. Jirgensons, G. Leitis, I. Kalvinsh, D. Robinson, P. Finn, N. Khan, in WO2008142376, **2008**.
- [300] J.-C. Chapuis, O. Khmour, X. Cai, J. Lu, S. M. Hecht, Synthesis and characterization of Dlac-acetogenins that potently inhibit mitochondrial complex I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 2204-2209.
- [301] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, Vsevolod V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 210-216.
- [302] E. Breinlinger, K. Cusack, T. Gordon, P. Gronsgaard, A. Hobson, B. Li, R. Stoffel, G. Wallace, L. Wang, in WO2009/11850, **2009**.
- [303] W. Fischer, V. Kvita, Aromatic Nucleophilic Substitution. Part 1. Regiospecific Substitution of the Nitro Groups in 3,5-Dinitrophthalic-Acid Derivatives. *Helvetica Chimica Acta* **1985**, *68*, 846-853.
- [304] H. J. Lee, S. J. Lim, S. J. Oh, D. H. Moon, D. J. Kim, J. Tae, K. H. Yoo, Isoindol-1,3-dione and isoindol-1-one derivatives with high binding affinity to beta-amyloid fibrils. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *18*, 1628-1631.
- [305] V. Bailleux, L. Vallee, J.-P. Nuyts, J. Vamecq, Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some N-Phthalimides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1994**, *42*, 1817-1821.
- [306] R. D. Carpenter, A. S. Verkman, Synthesis of a Sensitive and Selective Potassium-Sensing Fluorophore. *Organic Letters* **2010**, *12*, 1160-1163.
- [307] P. M. Worster, C. C. Lenzhoff, C. R. McArthur, N-(Ethoxycarbonyl)phthalimide. An Improved Procedure. *Journal of Organic Chemistry* **1979**, *45*, 174-175.
- [308] V. D. Sheludyakov, A. S. Tkachev, S. V. Sheludyakova, V. F. Mironov, Synthesis and properties of N,N-diacylcarbamoyl chlorides and derivatives based on them. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1977**, *47*, 1063-1068.
- [309] X.-A. Wu, P. Ying, J.-Y. Liu, H.-S. Shen, Y. Chen, L. He, Lithium Chloride-Assisted Selective Hydrolysis of Methyl Esters Under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications* **2009**, *39*, 3459-3470.
- [310] Z. Wang, R. B. Silverman, Syntheses and evaluation of fluorinated conformationally restricted analogues of GABA as potential inhibitors of GABA aminotransferase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 2242-2252.
- [311] S. Winter, H. Pracejus, Ueber α -Phthalimidoketenes. *Chemische Berichte* **1966**, *99*, 151-159.
- [312] M. Cushman, F. Mu, S. L. Coffing, D. J. Riese, R. L. Geahlen, P. Verdier-Pinard, E. Hamel, J. Johnson, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Lavendustin A Analogues That Inhibit EGFR and Syk Tyrosine Kinases, as Well as Tubulin Polymerization. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*, 441.
- [313] L. Czchujowski, H. Li, Compounds Based on meso-Tri(4-pyridyl)-p-acrylamidophenylporphyrin Able to Interact with DNA. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1997**, *34*, 999-1003.
- [314] SRu.Biosystem, (Ed.: <http://www.srubiosystems.com/Technology/index.htm>), **15.08.2011**.

- [315] V. J. Colandrea, G. A. Doherty, J. J. Hale, P. Huo, I. E. Legiec, L. M. Toth, P. Vachal, L. Yan, (3,4-Disubstituted)Propanoic Carboxylates as S1P (EDG) Receptor Agonists. *WO2005058848* **2005**.
- [316] G. Battistuzzi, S. Cacchi, G. Fabrizi, R. Bernini, 3-Arylpropanoate Esters through the Palladium-Catalyzed Reaction of Aryl Halides with Acrolein Diethyl Acetal. *Synlett* **2003**, 3, 1133-1136.
- [317] Clayden, Greeves, Warren, Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2001**.
- [318] A. G. Griesbeck, A. Henz, W. Kramer, J. Lex, F. Nerowski, M. Oelgemöller, K. Peters, E.-M. Peters, Synthesis of Medium- and Large-Ring Compounds Initiated by Photochemical Decarboxylation of ω -Phthalimidoalkanoates. *Helvetica Chimica Acta* **1997**, 80, 912-933.
- [319] D. Grée, R. Grée, A.-L. Blayo, S. L. Meur, New Enantioselective Synthesis of Monofluorinated Pyridines Designed for the Preparation of Chemical Libraries. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2008**, 350, 471-476.
- [320] B. König, P. Maity, M. Zabel, Tetrahydrofuran α -Tetrasubstituted Amino Acids: Two Consecutive β -Turns in a Crystalline Linear Tripeptide. *Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72, 8046-8053.
- [321] C. Y. Ho, E. Strobel, J. Ralbovsky, R. A. Glemmo, Improved Solution- and Solid-Phase Preparation of Hydroxamic Acids from Esters. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 4873-4875.
- [322] G. R. Reddy, A. S. Reddy, M. S. Kumar, A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, 6285-6288.
- [323] R. Chesworth, A. Ripka, G. Shapiro, in *WO2009/158393*, **2009**.
- [324] A. R. Gangloff, J. Litvak, E. J. Shelton, D. Sperandio, V. R. Wang, K. D. Rice, Synthesis of 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles using tetrabutylammonium fluoride as a mild and efficient catalyst. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 1441-1443.
- [325] L. He, Z. Fang, G.-C. Zhou, S.-L. Zheng, G.-L. He, J.-L. Li, D. Bei, Lithium chloride-catalyzed selective demethylation of aryl methyl ethers under microwave irradiation *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2007**, 274, 16-23.
- [326] A. H. Newman, S. S. Kulkarni, M.-F. Zou, J. Cao, J. R. Deschamps, A. L. Rodriguez, J. Conn, Structure-Activity Relationships Comparing N-(6-Methylpyridin-yl)-Substituted Aryl Amides to 2-Methyl-6-(substituted-arylethynyl)pyridines or 2-Methyl-4-(substituted-arylethynyl)thiazoles as Novel Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5 Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 3563-3575.
- [327] M. Alterman, A. Hallberg, Fast Microwave-Assisted Preparation of Aryl and Vinyl Nitriles and the Corresponding Tetrazoles from Organo-halides. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 65, 7984-7989.
- [328] L. Cai, X. Liu, X. Tao, D. Shen, Efficient Microwave-Assisted Cyanation of Aryl Bromide. *Synthetic Communications* **2004**, 34, 1215-1221.
- [329] E. H. Demont, B. I. Andrews, R. A. Bit, C. A. Campbell, J. W. B. Cooke, N. Deeks, S. Desai, S. J. Dowell, P. Gaskin, J. R. J. Gray, A. Haynes, D. S. Holmes, U. Kumar, M. A. Morse, G. J. Osborne, T. Panchal, B. Patel, A. Perboni, S. Taylor, R. Watson, J. Witherington, R. Willis, Discovery of a Selective S1P1 Receptor Agonist Efficacious at Low Oral Dose and Devoid of Effects on Heart Rate. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 2, 444-449.
- [330] J. Finkelstein, J. Frazee, C. Kaiser, L. Kruse, T. Leonard, in *US4992459*, **1991**.
- [331] C. Harris, A. D. Hobson, N. S. Wilson, in *WO2010093704*, **2010**.
- [332] V. M. Marx, H. Girgis, P. A. Heiney, T. Hegmann, Bent-core liquid crystal (LC) decorated gold nanoclusters: synthesis, self-assembly, and effects in mixtures with bent-core LC hosts. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, 18, 2983-2994.
- [333] S. Cui, S. D. Walker, J. C. S. Woo, C. J. Borths, H. Mukherjee, M. J. Chen, M. M. Faul, Practical Asymmetric Conjugate Alkynylation of Meldrum's Acid-Derived Acceptors: Access to Chiral β -Alkynyl Acids. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 436-437.
- [334] Q. Chao, K. G. Sprinkle, R. M. Grotzfeld, A. G. Lai, T. A. Carter, A. M. Velasco, R. N. Gunawardane, M. D. Cramer, M. F. Gardner, J. James, P. P. Zarrinkar, H. K. Patel, S. S. Bhagwat, Identification of N-(5-tert -Butyl-isoxazol-3-yl)-N'-{4-[7-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)imidazo[2,1-b][1,3]benzothiazol-2-yl]phenyl}urea Dihydrochloride (AC220), a Uniquely Potent, Selective, and Efficacious FMS-Like Tyrosine Kinase-3 (FLT3) Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 7808-7816.

- [335] A. M. Thompson, C. J. C. Connolly, J. M. Hamby, S. Boushelle, B. G. Hartl, A. M. Amar, A. J. Kraker, D. L. Driscoll, R. W. Steinkampf, S. J. Patmore, P. W. Vincent, B. J. Roberts, W. L. Elliott, W. Klohs, W. R. Leopold, H. D. Showalter, W. A. Denny, 3-(3,5-Dimethoxyphenyl)-1,6-naphthyridine-2,7-diamines and Related 2-Urea Derivatives Are Potent and Selective Inhibitors of the FGF Receptor-1 Tyrosine Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 4200-4211.
- [336] E. M. Zayed, A. A. A. Elbannany, S. A. S. Ghozlan, Studies on thiazolin-4-one: Synthesis of some pyrano[2,3-b]thiazole derivatives. *Pharmazie* **1985**, *40*, 194-197.
- [337] K. A. Jensen, I. Crossland, Studies of Thioacids and Their Derivatives. VII. On 2-Phenyl-4(5H)-Thiazolone. *Acta Chemica Scandinavica* **1963**, *17*, 144-162.
- [338] H. Schäfer, K. Gewalt, Reaktionen mit alpha-Cyan-alpha-acetyl-thioacetamid. *Journal für Praktische Chemie* **1975**, *317*, 771-778.
- [339] S. Barzen, Synthese und Charakterisierung von Inhibitoren der 5-Lipoxygenase mit Thiazol-Grundgerüst *Universität Frankfurt am Main* **2012**.
- [340] A. Živkovic, **2009**, Im persönlichen Gespräch.
- [341] Alan R. Katritzky, C. Cai, M. D. Collins, E. F. V. Scriven, S. K. Singh, Incorporation of Microwave Synthesis into the Undergraduate Organic Laboratory. *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 634-636.
- [342] Q.-D. You, Q. Yang, X.-J. Wang, Z.-Y. Li, L. Sun, Microwave-Assisted Esterification of Diverse Carboxylic Acids and Chiral Amino Acids. *Synthetic Communications* **2008**, *38*, 4107-4115.
- [343] M. C. Bagley, K. Chapaneri, C. Glover, E. A. Merritt, Simple Microwave-Assisted Method for the Synthesis of Primary Thioamides from Nitriles. *Synlett* **2004**, 2615-2617.
- [344] M. Furukawa, T. Okawara, H. Kashihara, A Facile Preparation of 4-Thiazolone Derivatives from Thioamides and Various Haloacyl Halides in a Biphasic System *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1985**, *33*, 3479 - 3483.
- [345] M. K. A. Ibrahim, Reaction of nitriles with mercaptoacetic acid. Facile synthesis of thiazolo[3,2-a]dihydropyridine and thiazolo[4,5-b]pyran derivatives *Journal of the Indian Chemical Society* **1989**, *66*, 395-397.
- [346] F. D. Bellamy, K. Ou, Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 839-842.
- [347] M. E. Maier, A. Zhdanko, A. Schmauder, C. I. Ma, D. Sibley, D. Sept, F. Sasse, Synthesis of Chondramide A Analogues with Modified β -Tyrosine and Their Biological Evaluation. *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 13349-13357.
- [348] B. Du, W. H. Starnes, in *US2005/49307*, **2005**.
- [349] D. Church, P. Gaillard, J. Klicic, V. Pomel, A. Quattropani, T. Rueckle, in *WO2007/23186*, **2007**.
- [350] S. T. Hodgson, Y. M. Lacroix, A. A. Procopiou, in *US2010/216860*, **2010**.
- [351] K. Goodman, D. Lee, in *WO2005/82890*, **2005**.
- [352] D. Sun, L. Sun, J. Wu, L. Zhang, M. Luo, Synthesis and Antifungal Activities of Some Novel Pyrimidine Derivatives. *Molecules* **2011**, *16*, 5618-5628.
- [353] G. Bouchain, D. Delorme, S. Frechette, F. Gaudette, L. Isakovic, S. Leit, O. Moradei, I. Paquin, S. Raeppl, A. Vaisburg, Z. Zhou, in *WO2005/92899*, **2005**.
- [354] S. Akinaga, F. Kanai, Y. Kanda, H. Kiyoi, T. Nakazato, T. Naoe, S. Nara, Y. Ohta, Y. Shiotsu, S. Tashiro, H. Umehara, in *EP1650194*, **2004**.
- [355] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.
- [356] OSIRISPropertyExplorer, in *Actelion* (Ed.: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).
- [357] ChemBioDraw, in *CambridgeSoft* (Ed.: Ultra_11.0).
- [358] N. E. Aucher, P. Martres, S. Meunier, in *WO2009/147121*, **2009**.
- [359] T. Kimura, J. Hosokawa-Muto, Y. Kamatari, K. Kuwata, Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their antiprion activity in TSE-infected cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 1502-1507.
- [360] N. Liu, S. J. Lord, W. E. Moerner, R. Samuel, R. J. Tweg, in *US2010/29952* **2010**.
- [361] Y. Yin, S. Xu, D. Chang, H. Zheng, J. Li, X. Liu, P. Xu, F. Xiong, One-pot synthesis of biopolymeric hollow nanospheres by photocrosslinking. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 8222-8224.
- [362] D. Ganeshpillai, B. V. L. Potter, A. Purohit, M. J. Reed, N. Vicker, S. Xiangdong, in *WO2005/42513*, **2005**.
- [363] F. Li, Q. Wang, Z. Ding, F. Tao, Microwave-Assisted Synthesis of Diaryl Ethers without Catalyst. *Organic Letters* **2003**, *5*, 2169-2171.

- [364] N. P. Bizier, J. W. Wackerly, E. D. Braunstein, M. Zhang, S. T. Nodder, S. M. Carlin, J. L. Katz, An Alternative Role for Acetylenes: Activation of Fluorobenzenes toward Nucleophilic Aromatic Substitution. *Journal of Organic Chemistry* **2013**, *78*, 5987–5998.
- [365] P. L. Coe, C. E. Scriven, Crossed coupling of functionalised ketones by low valent titanium (the McMurry reaction): a new stereoselective synthesis of tamoxifen. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1986**, (1972-1999), 475-478.
- [366] A. Zarei, A. Hajipour, L. Khazdooz, A One-Pot Method for the Iodination of Aryl Amines via Stable Aryl Diazonium Silica Sulfates Under Solvent-Free Conditions. *Synthesis* **2009**, *6*, 941-944.
- [367] V. M. D. G. Henriques, in *US2004/106592*, **2004**.
- [368] J. W. Lauher, Z. Li, F. W. Fowler, Weak Interactions Dominating the Supramolecular Self-Assembly in a Salt: A Designed Single-Crystal-to-Single-Crystal Topochemical Polymerization of a Terminal Aryldiacetylene. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 634-643.
- [369] W. B. Austin, N. Bilow, W. J. Kelleghan, K. S. Y. Lau, Facile Synthesis of Ethynylated Benzoic Acid Derivatives and Aromatic Compounds via Ethynyltrimethylsilane. *Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 2280-2286.
- [370] Á. González-Gómez, G. Domínguez, J. Pérez-Castells, Synthesis of Benzazepines by Gold-Catalysed Reactions of N-Allenylamides. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *2009*, 5057-5062.
- [371] T. Ljungdahl, T. Bennur, A. Dallas, H. Emtenäs, J. Mårtensson, Two Competing Mechanisms for the Copper-Free Sonogashira Cross-Coupling Reaction. *Organometallics* **2008**, *27*, 2490-2498.
- [372] V. A. Sedavkina, N. A. Morozova, A. Y. Egorova, I. G. Ostroumov, Synthesis of 5-alkyl-3H-thiolen-2-ones and 5-alkyl-3H-furan-2-ones and condensation reactions at the heterocyclic methylene group. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1987**, *23*, 377-380.
- [373] A. Tsolomitis, C. Sandris, Some observations concerning the lactonization of 3-aryloxypropionic acids. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1983**, *20*, 1545-1548.
- [374] A. Y. Egorova, Synthesis of arylidene derivatives of N-unsubstituted pyrrolin-2-ones. *Russian Chemical Bulletin* **2002**, *51*, 183-184.
- [375] J. DeRuiter, B. E. Swearingen, V. Wandrekar, C. A. Mayfield, Synthesis and in vitro aldose reductase inhibitory activity of compounds containing an N-acylglycine moiety. *Journal of Medicinal Chemistry* **1989**, *32*, 1033-1038.
- [376] S. K. Gandhi, C. S. Pande, R. K. Kaul, Synthese einiger Oxazolin-5-one. *Monatshefte für Chemie* **1967**, *98*, 1751-1753.
- [377] E. Vanotti, C. Santocanale, A. Ermoli, A. Bargiotti, M. G. Brasca, A. Ciavolella, N. Colombo, G. Fachin, A. Isacchi, M. Menichincheri, A. Molinari, A. Montagnoli, A. Pillan, S. Rainoldi, F. R. Sirtori, F. Sola, S. Thieffine, M. Tibolla, B. Valsasina, D. Volpi, Cell Division Cycle 7 Kinase Inhibitors: 1H-Pyrrolo[2,3-b]pyridines, Synthesis and Structure–Activity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 4380–4390.
- [378] Y. S. Laxmi, D. S. Iyengar, Synthesis and reactions of 5-benzylidene-2-phenyl-4,5-dihydro-1,3-oxazol-4-ones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1995**, *1995*, 3043-3045
- [379] P. J. Wagner, L. Wang, Electronic Effects of Ring Substituents on Triplet Benzylic Biradicals. *Organic Letters* **2006**, *8*, 645-647.
- [380] J. M. Villalgordo, X. Fontrodona, S. Díaz, A. Linden, Copper(I) Bromide-Mediated Synthesis of Novel 2-Arylthiazole-5-carboxylates from α -Diazo- β -Keto Esters and Aromatic Thioamides. *Synthesis* **2001**, *13*, 2021-2027.
- [381] E. N. Jacobsen, S. N. Goodman, A Practical Synthesis of α,β -Unsaturated Imides, Useful Substrates For Asymmetric Conjugate Addition Reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2002**, *344*, 953-956.
- [382] T. Fujikura, K. Niigata, in *US4731478*, **1988**.
- [383] T. Satoh, T. Kasuya, M. Ishigaki, M. Inumaru, T. Miyagawa, N. Nakaya, S. Sugiyama, Synthesis of Multi-Substituted Cyclobutanes and Alkylidenecyclobutanes by the Reaction of Cyclobutylmagnesium Carbenoids with Nucleophiles. *Synthesis* **2001**, *3*, 397-408.
- [384] H. J. C. Bezerra-Netto, D. I. Lacerda, A. L. P. Miranda, H. M. Alves, E. J. Barreiro, C. A. M. Fraga, Design and synthesis of 3,4-methylenedioxy-6-nitrophenoxyacetylhydrazone derivatives obtained from natural safrole: New lead-agents with analgesic and antipyretic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 7924–7935.

- [385] C. Pessoa, P. M. Ferreira, L. V. Lotufo, M. d. Moraes, S. Cavalcanti, L. C. Coêlho, M. Z. Hernandez, A. C. L. Leite, C. A. D. Simone, V. M. O. Souza, Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 523-528.
- [386] W. A. Carroll, M. J. Dart, J. M. Frost, T. Kolasa, S. P. Latshaw, B. Liu, M. Patel, A. Perez-Medrano, X. Wang, in *US2010/41720*, **2004**.
- [387] R. Olsson, H. C. Hansen, C.-M. Andersson, Microwave-assisted solvent-free parallel synthesis of thioamides. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 7947-7950.
- [388] M. S. C. Pedras, M. Jha, Concise Syntheses of the Cruciferous Phytoalexins Brassilexin, Sinalexin, Wasalexins, and Analogues: Expanding the Scope of the Vilsmeier Formylation. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 1828-1834.
- [389] J. Bergman, B. Pettersson, V. Hasimbegovic, P. H. Svensson, Thionations Using a P4S10–Pyridine Complex in Solvents Such as Acetonitrile and Dimethyl Sulfone. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 1546-1553.
- [390] J. Goerdeler, H. Horstman, Umsetzungen mit Dicarbonsäure-dichloriden. *Chemische Berichte* **1960**, *93*, 671-678.
- [391] R. Neidlein, Reaktionen mit Acyl-isocyanaten. *Archiv der Pharmazie* **1965**, *298*, 124-130.
- [392] K. Inamoto, Y. Arai, K. Hiroya, T. Doi, Palladium-catalysed direct synthesis of benzo[b]thiophenes from thioenols *Chemical Communications* **2008**, *43*, 5529-5531.
- [393] J.-F. Zhou, F.-X. Zhu, H.-Q. Zhu, Y.-L. Zhu, A facile synthesis of 3-aryl-2-mercaptoacrylic acid under microwave irradiation. *ARKIVOC* **2007**, *2007*, 213 - 217.
- [394] A. D. Abell, O. Zvarec, S. W. Polyak, W. Tieu, K. Kuan, H. Dai, D. S. Pedersen, R. Morona, L. Zhang, G. W. Booker, 5-Benzylidenerhodanine and 5-benzylidene-2-4-thiazolidinedione based antibacterials. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 2720-2722.
- [395] H. Li, J. Yang, S. Ma, C. Qiao, Structure-based design of rhodanine-based acylsulfonamid derivatives as antagonists of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 4194-4200.
- [396] C. D. Klein, C. Nitsche, Aqueous microwave-assisted one-pot synthesis of N-substituted rhodanines. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 5197-5201.
- [397] E. R. Biehl, S. Kamila, H. Ankati, An efficient microwave assisted synthesis of novel class of Rhodanine derivatives as potential HIV-1 and JSP-1 inhibitors. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 4375
- [398] X. Hu, N. Sun, B. Li, J. Shao, W. Mo, B. Hu, Z. Shen, A general and facile one-pot process of isothiocyanates from amines under aqueous conditions. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2012**, *8*, 61-70.
- [399] A. Khan, S. M. Kwasny, T. J. Opperman, N. P. Peet, J. D. Williams, in *WO2009/142720*, **2009**.
- [400] T. Srivastava, W. Haq, S. B. Katti, Carbodiimide mediated synthesis of 4-thiazolidinones by one-pot three-component condensation. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7619-7624.
- [401] S. E. A. Justus, H. T. Lee, J. K. Pontrello, B. D. Roth, K. E. Sexton, M. W. Wilson, in *US6506751*, **2003**.
- [402] A. Kunzler, P. D. Neuenfeldt, A. M. d. Neves, C. M. P. Pereira, G. H. Marques, P. S. Nascente, M. H. V. Fernandes, S. O. Hübner, W. Cunico, Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *64*, 74-80.
- [403] C. Xing, L. Wang, X. H. Tang, Y. Y. Sham, Development of selective inhibitors for anti-apoptotic Bcl-2 proteins from BHL-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 2167-2176.
- [404] G. Battistuzzi, S. Cacchi, G. Fabrizi, An Efficient Palladium-Catalyzed Synthesis of Cinnamaldehydes from Acrolein Diethyl Acetal and Aryl Iodides and Bromides. *Organic Letters* **2003**, *5*, 777-780.
- [405] A. J. Neeling, V. V. Kapoorchan, A. D. Knijnenburg, D. Noort, M. Overhand, H. S. Overkleeft, G. A. Van der marel, in *WO2010113042*, **2010**.
- [406] A. Orzeszko, J. Balzarini, B. Orzeszko, J. K. Maurin, Synthesis and anti-HIV studies of 2-adamantyl-substituted thiazolidin-4-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *42*, 993-1003.
- [407] K. A. Woerpel, D. J. Dibble, J. W. Ziller, Spectroscopic and X-ray Crystallographic Evidence for Electrostatic Effects in 4-Substituted Cyclohexanone-Derived Hydrazones, Imines, and Corresponding Salts. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 7706-7719.
- [408] P. Benderitter, W. Froestl, C. Hamel, H. Kroth, A. Muhs, N. Sreenivasachary, in *WO2011/128455*, **2011**.

- [409] D. J. Foley, S. A. M. Jeanmart, A. Longstaff, R. W. Parsons, C. J. Russell, J. B. Taylor, J. S. Wailes, in WO2011/007146, **2011**.
- [410] Y. Ding, K. L. Smith, C. V. N. S. Varaprasad, E. Chang, J. Alexander, N. Yao, Synthesis of thiazolone-based sulfonamides as inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 841-845.
- [411] P. S. Johar, C. V. Srinivasan, L. Wadhwa, in WO2008/75380, **2008**.
- [412] J. V. Metzger, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford, **1984**.
- [413] Q.-d. Youa, Q. Yanga, X.-j. Wang, Z.-y. Liab, L. Suna, Microwave-Assisted Esterification of Diverse Carboxylic Acids and Chiral Amino Acids. *Synthetic Communications* **2008**, *38*, 4107-4115.
- [414] H. Meerwein, E. Büchner, K. v. Emster, Über die Einwirkung aromatischer Diazoverbindungen auf α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen. *Journal für Praktische Chemie* **1939**, *152*, 237-266.
- [415] T. Oda, K. Notoya, M. Gotoh, S. Taketomi, Y. Fujisawa, H. Makino, T. Sohda, Synthesis of Novel 2-Benzothiopyran and 3-Benzothiepin Derivatives and Their Stimulatory Effect on Bone Formation. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 751-760.
- [416] Y. Tanabe, H. Yamamoto, M. Murakami, K. Yanagi, Y. Kubota, H. Okumura, Y. Sanemitsu, G. Suzukamo, Synthetic study of the highly potent and selective anti-platelet activating factor thiazolidin-4-one agents and related compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1995**, *1995*, 935-947.
- [417] M. Enomoto, N. Hara, Y. Hara, A. Kojima, i. N. Masa, H. Masumori, S. Morooka, in US5021435, **1991**.
- [418] F. A. J. Kerdesky, J. H. Holms, J. L. Moore, R. L. Bell, R. D. Dyer, G. W. Carter, D. W. Brooks, 4-Hydroxythiazole Inhibitors of 5-Lipoxygenase. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *34*, 2158-2165.
- [419] M. R. Heinrich, Intermolecular Olefin Functionalisation Involving Aryl Radicals Generated from Arenediazonium Salts. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15*, 810-833.
- [420] K. Okano, H. Fujiwara, T. Noji, T. Fukuyama, H. Tokuyama, Total Synthesis of Dictyodendrin A and B. *Angewandte Chemie, International Edition* **2010**, *49*, 5925-5929.
- [421] Q.-L. Zhou, J.-H. Xie, S. Liu, W.-L. Kong, W.-J. Bai, X.-C. Wang, L.-X. Wang, Highly Enantioselective and Diastereoselective Synthesis of Chiral Amino Alcohols by Ruthenium-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation of α -Amino Aliphatic Ketones. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 4222-4223.
- [422] T. Kenakin, A holistic view of GPCR signaling. *Nature Biotechnology* **2010**, *28*, 928-929.
- [423] Y. Fang, A. M. Ferrie, N. H. Fontaine, J. Mauro, J. Balakrishnan, Resonant Waveguide Grating Biosensor for Living Cell Sensing. *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 1925-1940.
- [424] R. Schröder, N. Janssen, J. Schmidt, A. Kebig, N. Merten, S. Hennen, A. Müller, S. Blättermann, M. Mohr-Andrä, S. Zahn, J. Wenzel, N. J. Smith, J. Gomeza, C. Drewke, G. Milligan, K. Mohr, E. Kostenis, Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nature Biotechnology* **2010**, *28*, 943-950.
- [425] R. Schröder, J. Schmidt, S. Blättermann, L. Peters, N. Janssen, M. Grundmann, W. Seemann, D. Kaufel, N. Merten, C. Drewke, J. Gomeza, G. Milligan, K. Mohr, E. Kostenis, Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nature Protocols* **2011**, *6*, 1748-1760.
- [426] Bei dem Messgerät handelte es sich um eine einmalige Leihgabe und der Hersteller ist mittlerweile nicht mehr am Markt vertreten.
- [427] A. Koch, J. Pfeilschifter, A. Huwiler, Sphingosine 1-Phosphate in Renal Diseases. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2013**, *31*, 745-760.
- [428] M. Brungs, O. Radmark, B. Samuelsson, D. Steinhilber, Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor (3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 107-111.
- [429] O. Werz, Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **2002**, *99*, 1044-1052.
- [430] Roche.Diagnostic..GmbH, <http://www.roche-applied-science.com/shop/products/cell-proliferation-reagent-wst-1#tab-3>, **Zugriff am 11.12.2013**.
- [431] Roche.Diagnostic.GmbH, <http://www.roche-applied-science.com/shop/en/de/products/cytotoxicity-detection-kit-ldh-#tab-3>, **Zugriff am 11.12.2013**.
- [432] D. W. Brooks, F. A. Kerdesky, J. H. Holms, in WO9009381, **1990**.
- [433] F. A. J. Kerdesky, J. H. Holms, D. W. Brooks, 4-Hydroxythiazoles as 5-Lipoxygenase Inhibitors US5124342 **1992**.

- [434] 1. H. Blain, C. Boileau, F. Lapique, E. Nédélec, D. Lœuille, C. Guillaume, A. Gaucher, C. Jeandel, P. Netter, J.-Y. Jouzeau, Limitation of the in vitro whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2002**, *53*, 255-265.
2. D. A. Smith, L. Di, E. H. Kerns, The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2010**, *9*, 929-939.
- [435] R. Steri, J. Achenbach, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, E. Proschak, Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *83*, 1674-1681.
- [436] K. E. Matsukuma, M. K. Bennett, J. Huang, L. Wang, G. Gil, T. F. Osborne, Coordinated Control of Bile Acids and Lipogenesis Through FXR Dependent Regulation of Fatty Acid Synthase *Journal of Lipid Research* **2006**, *47*, 2754-2761.
- [437] B. Forman, E. Goode, J. Chen, A. Oro, D. Bradley, T. Perlmann, D. Noonan, L. Burka, T. McMorris, W. Lamph, R. Evans, C. Weinberger, Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cellular Physiology and Biochemistry* **1995**, *81*, 687-693.
- [438] D. Merk, M. Schubert-Zsilavec, Diabetes: Neue Wirkstoffe in Aussicht. *Pharmazeutische Zeitung* **2012**, *28*.
- [439] M. Düfer, K. Hörth, R. Wagner, B. Schittenhelm, S. Prowald, T. Wagner, J. Oberwinkler, R. Lukowski, F. Gonzalez, P. Krippeit-Drews, G. Drews, Bile Acids Actually Stimulate Insulin Secretion of Mouse β -Cells via Farnesoid X Receptor Activation and ATP-Sensitive Potassium Channel Inhibition. *Diabetes* **2012**, *61*, 1479-1489.
- [440] M. Hörnig, S. Markoutsas, A.-K. Häfner, S. George, J. M. Wisniewska, C. B. Rödl, B. Hofmann, T. Maier, M. Karas, O. Werz, D. Steinhilber, Inhibition of 5-lipoxygenase by U73122 is due to covalent binding to cysteine 416. *Biochimica et Biophysica Acta* **2012**, *1821*, 279-286.
- [441] E. Leyva, D. d. Loera, S. Leyva, Photochemistry of 7-azide-1-ethyl-3-carboxylate-6,8-difluoroquinolone: a novel reagent for photoaffinity labeling. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 6759-6761.
- [442] J. Brunner, New Photolabeling and Crosslinking Methods. *Annual Review of Biochemistry* **1993**, *62*, 483-514.
- [443] V. Voskresenska, R. Marshall Wilson, M. Panov, A. N. Tarnovsky, J. A. Krause, S. Vyas, A. H. Winter, C. M. Hadad, Photoaffinity Labeling via Nitrenium Ion Chemistry: Protonation of the Nitrene Derived from 4-Amino-3-nitrophenyl Azide to Afford Reactive Nitrenium Ion Pairs. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 11535-11547.
- [444] L. J. Suva, M. S. Flannery, M. P. Caulfield, D. M. Findlay, H. Jüppner, S. R. Goldring, M. Rosenblatt, M. Chorev, Design, Synthesis and Utility of Novel Benzophenone Containing Calcitonin Analogs for Photoaffinity Labeling the Calcitonin Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1997**, *283*, 876-884.
- [445] C. Montecucco, G. Schiavo, 1-Palmitoyl-2-(p-benzoyl)benzoyl phosphatidylcholine, a photoactive phospholipid for the labelling of membrane components. *Biochemical Journal* **1986**, *237*, 309-312.
- [446] S. K. Chattopadhyay, C. V. Kumars, P. K. Das, Substituent Effects In The Quenching Of Acetophenone And Benzophenone Triplets By Oxygen And The Di-Tert-Butylnitroxy Radical, And The Efficiency Of Singlet Oxygen Photogeneration. *Journal of Photochemistry* **1985**, *30*, 81-91.
- [447] N. J. Cowley, The Mechanistic Photochemistry of 4-Hydroxybenzophenone *Queen's University Kingston, Ontario, Canada* **1997**.
- [448] S. G. Cohen, R. J. Baumgarten, Photoreduction of Benzophenone by Amines, Alcohols, and Hydrocarbons. Medium Effects. Photochemical Oxidative Deamination. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 3471-3475.
- [449] S. G. Cohen, R. J. Baumgarten, Photoreduction of Benzophenone by Amines. Photochemical Oxidative Deamination. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 2996-2997.
- [450] M. v. Raumer, P. Suppan, E. Haselbach, Photoreduction of triplet benzophenone by amines: role of their structure. *Chemical Physics Letters* **1996**, *252*, 263-266.
- [451] S. G. Cohen, W. V. Sherman, Inhibition and Quenching of the Light-induced Reductions of Benzophenone to Benzpinacol and to Benzhydrol. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 1642-1647.
- [452] N. C. Tice, C. A. Snyder, J. P. Selegue, C. E. Wallace, M. T. Blankenbuehler, S. Parkin, K. D. E. Allen, R. T. Beck, Synthesis, Characterization, and Structure of Cyclopenta[c]thiophenes and Their Manganese Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 15010.

- [453] A. Byung-Nak, B. Myung-Ho, C. Yu-Na, C. Hyun-Ho, C. Wonee, H. Youn, J. Sun-Ho, K. Bongtae, K. Dong-Hwan, K. Eunkyung, K. Hae-Sun, K. Jin-Kwan, K. Mi-Kyung, K. Soon-Hoe, L. Byung-Kyu, L. Chun-Ho, L. Joong-In, M. Ho-Sang, P. Chan-Sun, P. Sang-Kuk, S. Hyun-Joo, S. Chang-Yell, S. Young-Ah, S. Moon-Ho, W. Gil-Tae, Y. Moo-Hi, in WO2008/108602, **2008**.
- [454] R. M. Srivastava, J. V. d. Anjos, D. Sinou, S. J. d. Melo, Synthesis of glycosyl-triazole linked 1,2,4-oxadiazoles. *Carbohydrate Research* **2007**, *342*, 2440-2449.
- [455] A. R. Hajipour, A. Zarei, L. Khazdooz, B. B. F. Mirjalili, N. Sheikhan, S. Zahmatkesh, A. E. Ruoho, Silica Sulfuric Acid as an Efficient Heterogeneous Catalyst for the Synthesis of 1,1-Diacetates under Solvent-Free Conditions. *Synthesis* **2005**, *20*, 3644.
- [456] D. L. Boger, *Modern Organic Synthesis Lecture Notes*, TSRI Press, **1999**.
- [457] G. Revelant, S. Dunand, S. Hesse, G. Kirsch, Microwave-Assisted Synthesis of 5-Substituted 2-Aminothiophenes Starting from Arylacetaldehydes. *Synthesis* **2011**, *18*, 2935.
- [458] V. I. Maimind, K. M. Ermolaev, M. M. Shemyakin, Compounds labeled with carbon-14 and nitrogen-15. V. Synthesis of α -N15-amino acids. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1956**, *26*, 2313-2318.
- [459] LifeTechnologies,
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf,
Zugriff am 10.10.2013.
- [460] D. Steinhilber, T. Hermann, H. J. Roth, Separation of lipoxins and leukotrienes from human granulocytes by high-performance liquid chromatography with a Radial-Pak cartridge after extraction with an octadecyl reversed-phase column *Journal of Chromatography B* **1989**, *493*, 361-366.

11. Anhang

11.1 Publikationsliste

A. Lill, C. Rödl, D. Steinhilber, H. Stark., B. Hofmann. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.10.054: *Development and evaluation of ST-1829 based on 5-Benzylidene-2-phenylthiazolones as promising agent for anti-leukotriene therapy*

A. Lill, K. Scholich, H. Stark. *Tetrahedron Letters*, **2013**, *54*, 6682: *Synthesis of novel dansyl-labeled Celecoxib derivatives*

S. Barzen, C. Rödl, A. Lill, D. Steinhilber, H. Stark, B. Hofmann. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, *20*, 3575-3583: *Synthesis and biological evaluation of a class of 5-benzylidene-2-phenyl-thiazolinones as potent 5-lipoxygenase inhibitors*

A. Lill, H. Stark. *PZ Prisma*, **2012**, *19*, 17-27: *Sphingolipide – Fettähnliche Botenstoffe mit großer Wirkung*

A. Lill, A. Zivkovic, H. Stark. *Pharmazeutische Zeitung*, **2011**, *156*, (24), 18-25: *Multiple Sklerose – Fortschritt durch perorale Therapie*

A. Lill, H. Stark. *PZ Prisma*, **2011**, *18*, 200-202: *Multiple Sklerose – Neuer Therapieansatz mit Fingolimod*

Manuskript in Bearbeitung:

A. Lill, M. Gabler, D. Merck, D. Flesch, H. Stark., M. Schubert-Zsilavec.

Manuskript in Bearbeitung:

C. Wünsche, A. Koch, R. Goldschmeding A. Lill, H. Stark., D. Meyer zu Heringdorf, A. Huwiler, J. Pfeilschifter. **2014:** "Transforming growth factor $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) promotes connective tissue growth factor (CTGF) formation in human mesangial cells by upregulation of sphingosine 1-phosphate receptor 5 (S1P₅)"

11.2 Konferenzbeiträge

A. Lill, S. Barzen, C. Rödl, D. Steinhilber, B. Hofmann, H. Stark. *Structural modification of thiazolin-4-ones as potent 5-lipoxygenase inhibitors: 15th JCF Frühjahrssymposium*, 06.-09. März **2013**, Berlin, Germany; Book of Abstracts, Seite 120 (Poster 177)

A. Lill, S. Barzen, C. Rödl, D. Steinhilber, B. Hofmann, H. Stark. *Modification Of Thiazolinone Derivatives As Potent 5-Lipoxygenase Inhibitors: XXIInd International Symposium on Medicinal Chemistry*, 02.-06. September **2012**, Berlin, Germany; Book of Abstracts: ChemMedChem, Seite 211 (Poster 290)

H. Stark, A. Lill, S. Barzen, C. Rödl, D. Steinhilber, B. Hofmann. *Structural variations on the thiazolone derivative C06 as potent 5-lipoxygenase inhibitor: DPhG Jahrestagung*, 11.-13. Oktober **2012**, Greifswald, Germany; Tagungsband Seite 105 (Poster 50)

A. Zivkovic, **A. Lill**, S. Barzen, C. Rödl, D. Steinhilber, B. Hofmann, H. Stark. *Development of 5-lipoxygenase inhibitors of thiazolon class*: 4th UCT Science Day, 06. September **2012**, Frankfurt/Main, Germany

A. Lill, N. Abazi, K. Scholich, G. Geisslinger, H. Stark. *Pharmacological Tools for Sphingosine-1-phosphate Receptors*: 14th JCF Frühjahrssymposium, 18.-21. März **2012**, Rostock, Germany; Book of Abstracts, Seite 155 (Poster 106)

H. Stark, **A. Lill**, K. Deckmann, E. Proschak, S. Schiffmann, S. Grösch. *A Novel Pharmacological Tool: Fluorescent Celecoxibderivatives*: DPhG Jahrestagung, 04.-06. Oktober **2010**, Braunschweig, Germany; Tagungsband Seite 125 (Poster C134)

A. Lill, K. Deckmann, E. Proschak, S. Schiffmann, S. Grösch, H. Stark. *Fluorescent Celecoxib: A Novel Pharmacological Tool for Colon Cancer Cell Research*: 2nd UCT Science Day, 08. September **2010**, Frankfurt/Main, Germany; (Poster p22)

A. Lill, K. Deckmann, E. Proschak, S. Schiffmann, S. Grösch, H. Stark. *Novel Pharmacological Tools: Dansyl-Labeled Celecoxib Derivatives*: 3rd EuCheMS Chemistry Congress, 29. August - 02. September **2010**, Nürnberg, Germany; (Poster Vb.057)

A. Lill, K. Deckmann, E. Proschak, S. Schiffmann, S. Grösch, H. Stark. *Fluorescence-Labeled Celecoxib Derivatives as Novel Pharmacological Tools*: 240th ACS National Meeting & Exposition, 22.-26. August **2010**, Boston, USA; (Poster MEDI226)

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Andreas Lill, geb. 07.11.1983 in Hanau, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die von mir eingereichte Dissertation „Bioaktive Lipide - Funktionale Liganden des Lipidstoffwechsels“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt bzw. die wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hainburg, im Juni 2014

Andreas Lill
